

Bifidobacterium longum との共培養で発現する大腸菌プロモーターの同定

田村, 正典 / TAMURA, Masanori

(発行年 / Year)

2011-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2011-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2010 年度 修士論文

***Bifidobacterium longum* との共培養で発現する**

大腸菌プロモーターの同定

Identfication of *E. coli* promoter induced in co-culture with
Bifidobacterium longum.

指導教官 山本 兼由

法政大学大学院工学研究科

物質化学専攻修士課程

学生証番号 09R2113

田村 正典

<略語>

ACed	autoclaved
AI	autoinducer
Amp	ampicillin
<i>Bifido.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>B. adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>B. angulatum</i>	<i>Bifidobacterium angulatum</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>B. catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>
<i>B. dentium</i>	<i>Bifidobacterium dentium</i>
<i>B. kashiwanohense</i>	<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>
<i>B. longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>
<i>B. pseudolongum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>
<i>B. scardovii</i>	<i>Bifidobacterium scardovii</i>
<i>B. sp. HM5-2</i>	<i>Bifidobacterium sp. HM5-2</i>
bp	base pair(s)
BPB	Bromophenol blue
CFU	colony forming unit
CM	conditioned medium
ddH ₂ O	double distilled water
DEPC	diethylpyrocarbonate
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	Enhanced GFP
EtBr	ethidium bromide
EtOH	ethanol
FITC	fluorescein-4-isothiocyanate
GFP	green fluorescent protein
Gly	glycine
LB	Luria-Bertani
MW	molecular weight
NaOAc	sodium acetate
OD	optical density

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PhOH	phenol
PPT	promoter project team
PTA	phosphotungstic acid
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
rpm	revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser	serine
TCS	two component system
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmission Electron Microscope
Tris	tris(hydroxymethyl) amino methane
Tyr	tyrosine

<目次>

	頁
第1章 序論	1
第2章 実験材料と方法	5
2-1. 汎用試薬	5
2-1-1. ABCM 液体培地	5
2-1-2. BL 寒天培地	5
2-1-3. LB 液体培地	5
2-1-4. LB 寒天培地	5
2-1-5. 100 mg/mL Amp	6
2-1-6. 0.1 M CaCl ₂	6
2-1-7. 0.1% DEPC water	6
2-1-8. 0.5 M EDTA(pH8.0)	6
2-1-9. 70% EtOH	6
2-1-10. 60% Glycerol	6
2-1-11. 5 N HCl	7
2-1-12. H ₂ O 飽和 PhOH	7
2-1-13. 5 N NaOH	7
2-1-14. 1 M NaOAc	7
2-1-15. 3 M NaOAc	7
2-1-16. 1% PTA	7
2-1-17. 10% SDS	7
2-1-18. Solution A	8
2-1-19. 50X TAE buffer	8
2-1-20. 1X TAE buffer	8
2-1-21. 10X TBE buffer	8
2-1-22. 1.2X TBE buffer	8
2-1-23. TE 飽和 PhOH	8
2-1-24. 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0 at 4°C)	9
2-1-25. 0.5 M Tris-HCl(pH 8.0 at 4°C)	9
2-2. 細菌株	9
2-3. プラスミドとプライマー	9
2-4. 大腸菌とビフィズス菌の純粋培養	10

2-5.	大腸菌とビフィズス菌の共培養における増殖曲線と pH の測定	11
2-6.	CFU/mL による液体培養液中の生菌数の測定	11
2-7.	大腸菌及びビフィズス菌の培養上清による CM 調製	11
2-8.	透過型電子顕微鏡による細菌細胞の観察	12
2-9.	PPT クローンの作製	12
2-10.	蛍光プレートリーダーによる大腸菌細胞内の GFP 蛍光強度の測定	17
2-10-1.	BioTek 製 PL600 による GFP 蛍光強度の測定	17
2-10-2.	コロナ電気製 MTP-880 による GFP 蛍光強度の測定	17
2-11.	フローサイトメトリーによる大腸菌細胞内の GFP 蛍光強度の測定	17
2-12.	PPT クローンを用いたプライマー伸長法による転写開始点の決定	17
第3章	結果	21
3-1.	大腸菌 W3110 と各種ビフィズス菌の形態、生育及びコロニー形成	21
3-1-1.	形態	21
3-1-2.	増殖曲線と培養液 pH	23
3-1-3.	コロニー形成	26
3-2.	大腸菌 W3110 と各種ビフィズス菌の共培養	26
3-2-1.	共培養時の増殖曲線と培養液 pH	26
3-2-2.	定常期共培養液中の生菌数	30
3-2-3.	共培養実験の総括	32
3-3.	<i>B. longum</i> との共培養で発現する大腸菌プロモーター	32
3-3-1.	<i>B. longum</i> との共培養定常期に発現する大腸菌プロモーター	32
3-3-2.	ビフィズス菌培養上清で発現する大腸菌プロモーター	37
3-3-2-1.	<i>B. longum</i> の培養上清で発現する大腸菌プロモーター	37
3-3-2-2.	他種ビフィズス菌培養上清で発現する大腸菌プロモーター	38
3-3-2-3.	熱処理した細菌培養上清で発現する大腸菌プロモーター	39
3-3-3.	<i>B. longum</i> との共培養後早期に発現する大腸菌プロモーター	41
3-3-3-1.	<i>B. longum</i> との共培養後早期に発現する大腸菌プロモーター	41
3-3-3-2.	<i>proX</i> プロモーターの転写開始点の決定	44
3-3-3-3.	<i>rpoS</i> , <i>beaSR</i> , <i>cpxAR</i> の <i>proX</i> プロモーター発現への影響	46
第4章	考察	48

4-1.	大腸菌 W3110 と各種ビフィズス菌の共培養で形成される細菌叢	48
4-2.	<i>B. longum</i> と共存時の大腸菌の応答機構	48
第5章	参考文献	51
第6章	謝辞	53

第1章 序論

大腸菌はグラム陰性の通性嫌気性桿菌で分子生物学の分野でモデル生物として最も研究が行われてきた生物種である。大腸菌 K-12 株ゲノムはおよそ 4.6 Mbp の環状 DNA であり、そのゲノム上には 4453 の遺伝子がコードされている (Fig. 1, Table 1)(Blattner et al., 1997; Riley et al., 2006)。そのうち現在までに 2825 の遺伝子について実験的に機能が証明されている。また実験的証明はなされていないが 1157 の遺伝子について、その DNA 配列から機能が予測されている。しかし残りの 471 の遺伝子については全くの機能未知である。大腸菌遺伝子研究は長年行われているにもかかわらず、未だ全体の 10 %以上の遺伝子の機能が未知のままである。遺伝子の全貌解明に至らない要因の一つとして、実験室における実験環境の自然界からの乖離が考えられる。本来、自然界で細菌は様々な環境中に生育しており、その菌体は絶えず化学的・物理的・生物学的な外的作用を受けている。その外的作用に対し、ゲノム上に内包される多数の遺伝子の中から適応する為の遺伝子を選択的に発現することで生存している。しかし、今日まで行われている大腸菌遺伝子研究のほとんどが純粋培養系であり、また大腸菌が増殖しやすい環境を整えた実験系による解析である。この実験環境と自然環境の乖離が機能未解明な遺伝子が多く存在している要因と考えられる。

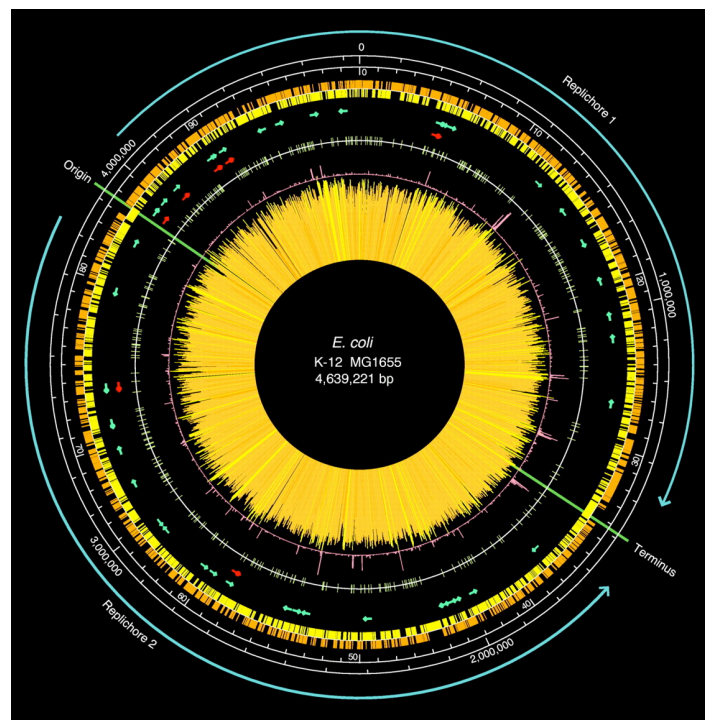


Fig. 1. 大腸菌 K-12 株のゲノム

全長 4,639,221 bp の環状 DNA である。Blattner et al., 1997 から引用

Table 1. 大腸菌 K-12 株ゲノムにおける遺伝子の分類

Gene type	Experimental	predicted	
Enzyme	1094	390	
Transporter	337	254	
Regulator	241	164	
Membrane	43	210	
Factor	150	60	
Structural componet	89	37	
Carrier	77	42	
RNA	156		
Lipoprotein	46		
Cell process	56		
Leader peptide	11		
Psudogenes in common	74		
Site (<i>oriC</i>)	1		
Phage/IS in common	304		
(including 15 psudogenes)			
Partial information	146		
Unknown function		471	
Total	2825	1628	4453

Riley et al., 2006 から引用

近年、Quorum sensing (QS)と称され細菌細胞間コミュニケーションの存在が報告された。この QS システムでは細菌が autoinducer(AI)と呼ばれる細菌性ホルモン分子を介した細菌間コミュニケーションをとっている。このシステムでは細菌は AI を一定量菌外へ放出しており、周囲の細菌の存在密度が低い状態だと AI 濃度は低いままであるが、細菌の存在密度が上昇すればそれに伴い AI 濃度も上昇する。細菌はこの AI の環境中濃度を感知することで周囲の細胞密度を認識し、細胞密度によって自身の遺伝子発現を変化させ、発光物質の産生やバイオフィルムの形成などの挙動を示す。(Fig. 2)(Miller and Bassler, 2001)。最初に QS の存在が報告されたのは *Vibrio fischeri* における菌の増殖に伴う蛍光物質の産生である(Nealson et al., 1970)。その後、大腸菌、緑膿菌、ブドウ球菌などで同様のシステムの存在が報告された。QS を引き起こす AI にはいくつか種類があり、*Vibrio fischeri* や緑膿菌など多くのグラム陰性菌は *N*-acyl homoserine lactone(AI-1)を産生している(Miller and Bassler, 2001)。さらに同じ菌種でも acyl 基の炭素数の異なる複数種の AI-1 を産生している。この AI-1 には一旦菌体外へ出た後、再び菌体内に入りターゲット遺伝子のレギュレーターと結合することで遺伝子の発

現を調節するものと、菌体表層での two-component system(TCS)を介したシグナル伝達によりターゲット遺伝子の発現を調節するタイプがある。この AI-1 は主にグラム陰性菌間でのコミュニケーションを媒介している。またブドウ球菌などのグラム陽性菌間では短鎖ペプチドを介した QS が報告されている(Miller, M., and Bassler, B., 2001)。短鎖ペプチドは TCS を介したシグナル伝達によりターゲット遺伝子の発現を調節している。さらに大腸菌や *Vibrio harveyi* は AI-1 とは異なる AI-2 と称される furanosyl borate diester を産生している(Sperandio et al., 2003)。AI-2 は細胞の TCS を介したシグナル伝達によりターゲット遺伝子の発現を調節している。AI-2 の前駆体である 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione の合成は LuxS により行われるが、この LuxS をコードする *luxS* 遺伝子はグラム陰性菌、グラム陽性菌に保存されている(Bassler and Losick, 2006)。これらのことからグラム陰性菌-グラム陽性菌間でのコミュニケーションを媒介している。以上のように QS システムは様々な細菌に存在しており、細菌は集団で互いにコミュニケーションをとり社会的に秩序をもって生息していることが示唆している。

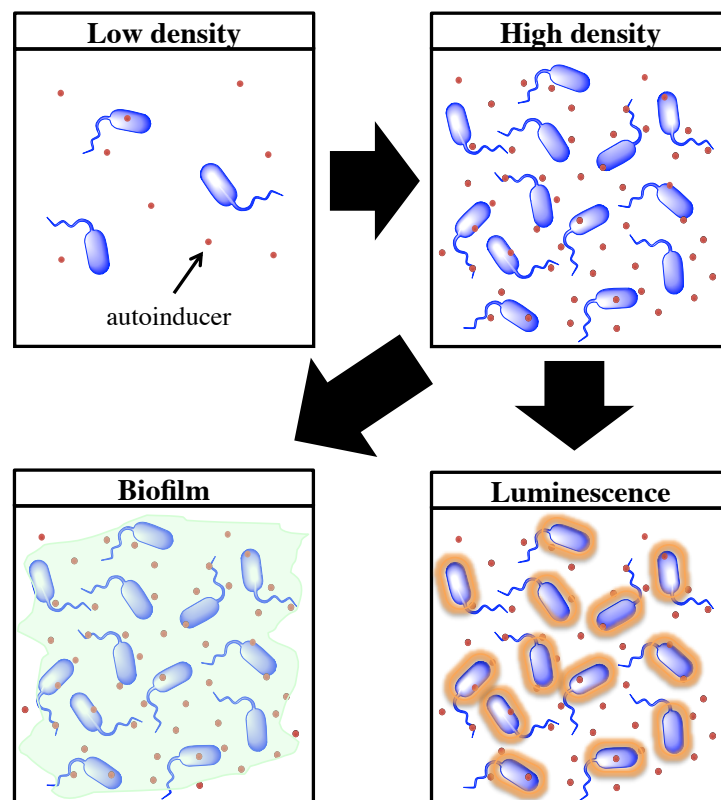


Fig. 2. クオラムセンシングシステムの概要

細菌細胞が低密度では AI 濃度は低い状態だが、細菌が増殖し高密度になると AI 濃度も上昇する。AI 濃度が閾値を超えると、特定の遺伝子発現を誘導し、バイオフィルムの形成や発光現象などが起きる。

大腸菌はその名の通り、自然界では主に動物腸内に生息している細菌である。動物腸内には大腸菌以外にもビフィズス菌、乳酸菌、連鎖球菌といった様々な腸内細菌が多数生息しており、それらが互いに影響し合い腸内フローラを形成している (青木 阜 2004)。多数の細菌が生息している動物腸内では QS を含む積極的な細菌間コミュニケーションシステムが働いていることが考えられる。

数多く存在する腸内細菌の中でも大腸菌と同様に動物大腸に多く生息する細菌としてビフィズス菌が挙げられる。ビフィズス菌はグラム陽性菌の偏性嫌気性桿菌である。また桿菌とされるが不定形の細菌であり、二つに分岐するような形をとることがある (Fig. 3)。ビフィズス菌は多数の動物の腸内、胃、虫歯、糞便からも単離されており、ヒト由来のビフィズス菌は現在 9 種類 (*Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium parvulum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*) が単離されている。

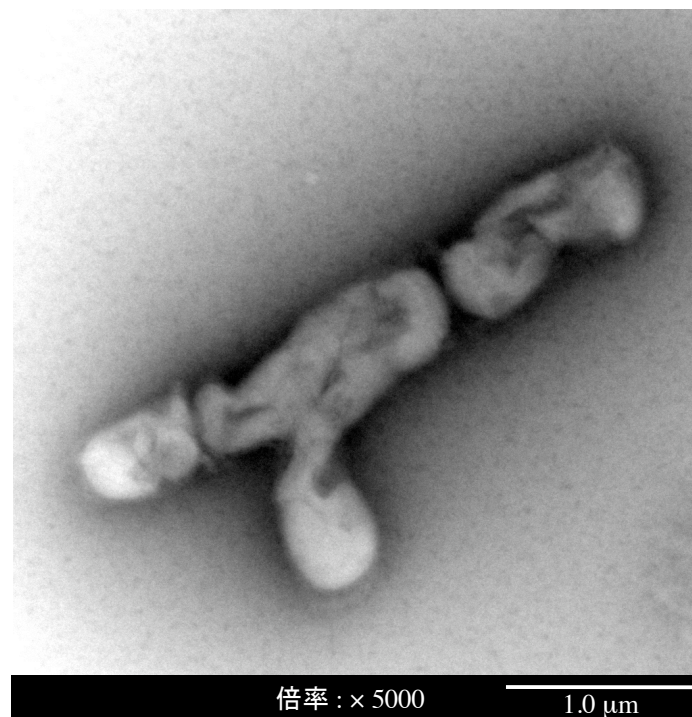


Fig. 3. *B. longum* の透過型電子顕微鏡写真

本研究では今まで行われてきた実験室環境よりも自然環境に近い腸内環境を想定したビフィズス菌との共培養系で実験を行うことで、未知であった大腸菌遺伝子の機能解明を目指すとともに、新たな細菌間コミュニケーションシステムの解明を目標とした。

第2章 実験材料と方法

2-1. 汎用試薬

2-1-1. ABCM 液体培地

1L の ddH₂O に対し ABCM BROTH(栄研化学製)を 42 g の割合で溶解させ、ガラスのメジューム瓶にいれオートクレーブにて 121℃ で 21 分滅菌し、常温で保存した。必要に合わせて 100 mg/mL の Amp 溶液を終濃度 100 µg/mL で添加して使用した。抗生物質を添加した際の培地の使用期限は 1 ヶ月とし、また 4℃ で保存した。

2-1-2. BL 寒天培地

1L の ddH₂O の入ったフラスコに BL AGAR(栄研化学製)を 60 g 溶解させ、オートクレーブにて 121℃ で 21 分滅菌し、50℃ 程度まで冷却した。冷却後、5 vol% の割合で馬脱繊維血液(日本バイオテスト研究所製)を添加し、よく混合してからシャーレに 20 mL 程度ずつ分注して冷却した。培地が固化したらシャーレ内の結露を乾燥させてから袋に入れ 4℃ で保存した。この寒天培地の使用期限は 2 ヶ月とした。

2-1-3. LB 液体培地

BACTO TRYPTON(DIFCO)を 10 g, BACTO YEAST EXTRACT(DIFCO)を 5g, NaCl を 10g, 5 N NaOH を 0.75 mL を ddH₂O に溶解し全容量を 1L に入れ、ガラスのメジューム瓶にいれオートクレーブにて 121℃ で 21 分滅菌し、常温で保存した。必要に合わせて 100 mg/mL の Amp 溶液を終濃度 100 µg/mL で添加して使用した。抗生物質を添加した際の培地の使用期限は 1 ヶ月とし、4℃ で保存した。

2-1-4. LB 寒天培地

BACTO TRYPTON(DIFCO)を 10 g, BACTO YEAST EXTRACT(DIFCO)を 5g, NaCl を 10g, BACTO AGAR(DIFCO)を 15 g, 5 N NaOH を 0.75 mL を 1L の ddH₂O の入ったフラスコに加え混合し、オートクレーブにて 121℃ で 21 分滅菌し、60℃ 程度まで冷却した。ここで必要に合わせて 100 mg/mL の Amp 溶液を終濃度 100 µg/mL で添加した。冷却後、シャーレに 20 mL 程度ずつ分注して冷却した。培地が固化したらシャーレ内の結露を乾燥させてから袋に入れ 4℃ で保存した。抗生物質を添加した際の培地の使用期限は 1 ヶ月とした。

2-1-5. 100 mg/mL Amp

15 mL のチューブ(IWAKI 製)にアンピシリンナトリウムを 1 g 計り入れ、そこに ddH₂O をチューブの目盛りの 10 mL まで入れて完全に溶解する。次に溶解液を 10 mL のシリンジ(テルモ製)とΦ0.22 mm の Cellulose Acetate フィルター(DISMIC 製)を使いフィルター滅菌して新しい 15 mL チューブに移し、4°C で保存した。使用期限は 1 ヶ月とした。

2-1-6. 0.1 M CaCl₂

80 mL 程度の ddH₂O を入れたビーカーに CaCl₂・H₂O を 14.7 g 入れスターラーで攪拌し溶解させた。溶解後、メスシリンダーに溶液を移し、ddH₂O を加えて全容量を 100 mL にした。ガラス瓶に移し、オートクレーブにて 121°C、21 分の滅菌を行い、その後 4°C で保存した。

2-1-7. 0.1% DEPC water

ガラス瓶に 1 L の ddH₂O を入れ、そこに DEPC を 1 mL 加え瓶を密栓してよく混合してから 2 時間以上常温で放置した。瓶のふたを少しゆるめてからオートクレーブにて 121°C、21 分の処理を行い未反応分の DEPC を分解揮発させた。オートクレーブ後は常温で保存した。

2-1-8. 0.5 M EDTA(pH 8.0)

ビーカーに入った 350 mL 程度の ddH₂O に EDTA 2Na・2H₂O を 93.06 g 加え、スターラーで攪拌しながら pH メーターで pH の測定を始めた。5 N NaOH を溶液中の個体が全て溶けてさらに pH が 8.0 になるまで加えた。メスシリンダーに移し ddH₂O を加え全容量を 500 mL にした。その後、ガラス瓶に移しオートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、4°C で保存した。

2-1-9. 70% EtOH

メスシリンダーに EtOH を 70 mL 入れ、ddH₂O で全容量を 100 mL とした。ガラス瓶で常温保存した。

2-1-10. 60% Glycerol

メスシリンダーに 60 mL の Glycerol を入れ、ddH₂O を加え全容量を 100 mL にした。その後、ガラス瓶に移しオートクレーブにて 121°C、21 分の滅菌を行

い、その後 4°C で保存した。

2-1-11. 5 N HCl

12 N HCl をメスシリンダーで 40 mL 計り取り、ddH₂O の入ったビーカーに加えていき全量を 96 mL にする。ガラス瓶に入れ常温で保存した。

2-1-12. H₂O 飽和 PhOH

50 mL のチューブに結晶 PhOH を 50 mL の目盛りまで入れ、そこに 0.1% DEPC water をチューブの 50 mL の目盛りまで加え、60°C の恒温槽で溶解させた。その後、水相と PhOH 相が完全に分離するまで 4°C で放置した。保存も 4°C で行った。

2-1-13. 5 N NaOH

粒状 NaOH を終濃度 5 M となるよう ddH₂O に溶解し、プラスチック容器に入れ常温で保存した。

2-1-14. 1M NaOAc

ビーカーに入った 400 mL 程度の ddH₂O に NaOAc を 41 g 加え溶解した後、メスシリンダーに移し全容量が 500 mL なるまで ddH₂O を加えた。ガラス瓶に移し、オートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、4°C で保存した。

2-1-15. 3 M NaOAc

ビーカーに入った 400 mL 程度の ddH₂O に NaOAc を 123 g 加え溶解した後、メスシリンダーに移し全容量が 500 mL なるまで ddH₂O を加えた。ガラス瓶に移し、オートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、4°C で保存した。

2-1-16. 1% PTA

15 mL のチューブに入った 8 mL の ddH₂O に PTA(nacalai tesque)を 0.1 g 溶解させ、pH メーターで pH を測定しながら 5N NaOH で pH 7.0 に調製し、その後チューブの目盛りで 10 mL まで ddH₂O を加え混合して 4°C で保存した。

2-1-17. 10% SDS

ビーカーに入った 450 mL 程度の ddH₂O に SDS を 50 g 溶解させた後、ddH₂O

で全容量を 500 mL にしガラス瓶に移して常温で保存した。

2-1-18. Solution A

ガラス瓶に 455 mL の 0.1% DEPC water、10 mL の 0.5 M EDTA(pH 8.0)、10 mL の 1 M NaOAc、を加えオートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し常温まで冷却した後、25 mL の 10% SDS を加え混合し、常温で保存した。

2-1-19. 50X TAE buffer

ビーカーに 500 mL 程の ddH₂O 入れ、Tris を 242 g、Acetic acid を 57.1 mL、0.5 M EDTA(pH 8.0)を 100 mL を加え完全に溶解してから、メスシリンダーに移し ddH₂O を加えて全容量を 1 L にした。溶液をガラス瓶に移し常温で保存した。

2-1-20. 1X TAE buffer

メスシリンダーに 50× TAE を 20 mL を入れ、ddH₂O で全容量を 1 L にした。常温で保存した。

2-1-21. 10X TBE buffer

ビーカーに 800 mL 程の ddH₂O 入れ、Tris を 108 g、Boric acid を 55 g、0.5 M EDTA(pH 8.0)を 40 mL を加え完全に溶解してから、メスシリンダーに移し ddH₂O を加えて全容量を 1 L にした。溶液をΦ 0.22 mm フィルター(IWAKI)にて濾過してゴミを取り除いてからガラス瓶に移し常温で保存した

2-1-22. 1.2X TBE buffer

メスシリンダーに 10× TBE を 120 mL を入れ、ddH₂O で全容量を 1 L にした。常温で保存した。

2-1-23. TE 飽和 PhOH

アルミニウム箔で遮光したビーカーに結晶 PhOH を 500 g、8-hydroxyquinoline を 0.5 g、0.5 M Tris-HCl(pH 8.0 at 4°C)を 500 mL 入れ結晶 PhOH が溶解するまで 60°C の恒温槽内においた。結晶 PhOH 溶解後、4°C まで冷却し、スターラーで 30 分程度攪拌混合して PhOH 相に Tris-HCl を溶け込ませた。その後一晩 4°C で放置して PhOH 相と水相を完全に分離し、水相をアスピレーターで吸引し除去した。次に再び 0.5 M Tris-HCl(pH 8.0 at 4°C)を 500 mL 入れスターラーで 30 分程

度攪拌混合し PhOH 相に Tris-HCl を溶け込ませた。pH メーターで溶液の pH を測定し、pH 7.8 以上であることを確認した。pH 7.8 以下だった場合は一晩 4°C で放置して PhOH 相と水相を完全に分離し、水相をアスピレーターで吸引し除去してから 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0 at 4°C)を 500 mL 入れスターラーで 30 分程度攪拌混合した。pH 7.8 以上であることが確認できたら一晩 4°C で放置して PhOH 相と水相を完全に分離し、水相をアスピレーターで吸引除去し残った PhOH 相をガラス製の遮光瓶に移し、0.1 M Tris-HCl(pH 8.0 at 4°C)を PhOH 相を覆うまで加えた。最後に PhOH 相と加えた 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0 at 4°C)の合計体積に対し、終濃度 1 mM となるよう 0.5 M EDTA (pH 8.0)を添加しよく混合した後 4°C で保存した。

2-1-24. 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0 at 4°C)

ビーカーに入った 700 mL 程度の ddH₂O に Tris を 12.11 g 加えスターラーで攪拌して溶解させた。大きめの容器に氷水を作り、そこにビーカーを置きスターラーで回しながら冷却し、pH メーターで pH と温度を測定しながら、4°C で pH 8.0 になるよう 5N HCl で調整した。その後、溶液の全量を ddH₂O で 1 L にしてガラス瓶に移し、オートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、4°C で保存した。

2-1-25. 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0 at 4°C)

ビーカーに入った 700 mL 程度の ddH₂O に Tris を 60.55 g 加えスターラーで攪拌して溶解させた。大きめの容器に氷水を作り、そこにビーカーを置きスターラーで回しながら冷却し、pH メーターで pH と温度を測定しながら、4°C で pH 8.0 になるよう 5N HCl で調整した。その後、溶液の全量を ddH₂O で 1 L にしてガラス瓶に移し、オートクレーブにて 121°C で 21 分滅菌し、4°C で保存した。

2-2. 細菌株

本研究では大腸菌 K-12 株と 11 種類のビフィズス菌株を使用した。用いた全ての細菌株を Table 2 に示す。

2-3. プラスミドとプライマー

本研究で用いたプラスミドとプライマーを Table 3 に示す。PPT クローンは 904 種類の大腸菌プロモーターが GFP をレポーター遺伝子として持つ pGRP ベクターにクローン化されたセットである (Makinoshima et al., 2002)。全 PPT クローンのプラスミド及び構築に用いたプライマーは Table S1 (巻末に付則) に示す。

Table 2. 使用した菌株

Strain	Characterization or Source	Institute No. or Reference
<i>Escherichia</i>		
<i>E. coli</i> W3110	F, λ , IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1	Jishage & Ishihama, 1997
<i>E. coli</i> DH5a	F, Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK, mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ , <i>thi</i> -	Takara
<i>E. coli</i> BW25113	Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ , rph-1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Haldman & Wanner, 2001
<i>E. coli</i> BW27553	BW25113, Δ (<i>baeS-baeR</i>)579	Zhou et al., 2003
<i>E. coli</i> BW27559	BW25113, Δ (<i>cpxA-cpxR</i>)623	Oshima et al., 2002
<i>E. coli</i> JW5437	BW25113, Δ <i>rpoS</i>	Baba et al., 2006
<i>Bifidobacterium</i>		
<i>B. adolescentis</i>	Intestine of adult	ATCC 15703
<i>B. angulatum</i>	Human feces	ATCC 27535
<i>B. bifidum</i>	Feces of breast-fed infant	ATCC 29521
<i>B. catenulatum</i>	Human feces	ATCC 27539
<i>B. dentium</i>	Dental caries	ATCC 27534
<i>B. kashiwanohense</i>	Faeces of healthy infant	JCM 15439 ^T
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Intestine of adult	ATCC 15707
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Feces of infant	ATCC 27919
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Swine feces	ATCC 25526
<i>B. scardovii</i>	Human blood, Sweden	ATCC BAA-773
<i>B. sp.</i> HM5-2		

Table 3. 主に使用したプラスミド及びプライマー

Name	Characterization and Sequence
Plasmid	
pGRP	<i>gfp</i> reporter vector
pGRN104	pGRP, <i>yjbJ-gfp</i>
pGRK252	pGRP, <i>proX-gfp</i>
pGRH313	pGRP, <i>ygiT-gfp</i>
Primer	
Anti-EGFP	5'-AGGGTCAGCTTGCCGTAGG-3'
EGFP-anti-FITC	5'-AGGGTCAGCTTGCCGTAGG-3'

2-4. 大腸菌とビフィズス菌の純粋培養

本研究では特に断りがない限り、前培養については、大腸菌は寒天培地に形成しているコロニーから、ビフィズス菌は-80℃で凍結保存されているものから白金耳で培養液に植菌した。また好気条件での細菌の液体培地培養は37℃の恒温槽で160 min⁻¹の震とう培養で行い、寒天培地の培養は37℃のインキュベーター(ヤマト科学製 ICL300)で行った。窒素嫌気条件での細菌の液体及び寒天培地培養はCoy Laboratory 製 Vinyl Anaerobic Chambers の37℃のインキュベーター内

で静置して行い、CO₂ 嫌気条件での菌の液体及び寒天培養は真空ポンプと CO₂ ガスボンベにより内部を CO₂ に置換した嫌気ジャーを 37°C のインキュベーター (SANYO 製 MOV-112S) に静置することで行った。細菌の増殖曲線は比色計 (TAITEC 製 Mini photo 518R) を用いて OD₆₀₀ によって培養液濁度を測定した。

2-5. 大腸菌とビフィズス菌の共培養における増殖曲線と培養液 pH の測定

ABCM 培地 5 mL に大腸菌とビフィズス菌を窒素嫌気条件下の 37°C で一晩前培養を行った。その後、新たな ABCM 培地に、植菌する培地の容量に対し 100 分の 1 量の各菌の前培養液を添加し、窒素嫌気条件下の 37°C にて本培養を行った。また、2 種類の菌を混合した共培養で行う場合には 200 分の 1 の容量ずつ 2 種類の菌の前培養液を加え窒素嫌気条件下の 37°C にて本培養した。本培養を開始した時間を 0 時間として 24 時間まで経時的に増殖曲線と培地 pH をモニターした。培養液 pH は pH 試験紙を用い培養液 30 µL を滴下して試験紙の色を肉眼で判断することで測定した。

2-6. CFU/mL による培養液中の生菌数の測定

生菌数を確認する細菌培養液を段階希釈で 10⁴~10⁸ 倍に希釈した。段階希釈は 1.5 mL チューブに 900 µL の ABCM 培地に対し 100 µL の培養液を混合する 10 倍希釈を段階的に行い各希釈度の菌溶液を得た。得られた各希釈度の菌溶液 100 µL を BL 寒天培地に塗布して CO₂ 嫌気条件下の 37°C で 24~48 時間培養を行った。培養後、形成されたコロニーをカウントして希釈率と塗布した溶液量から CFU/mL を算出した。

2-7. 大腸菌及びビフィズス菌培養上清による CM 調製

CM を作製する細菌を ABCM 培地 5 mL、窒素嫌気条件下の 37°C で一晩前培養した。次に 300 mL のフラスコに入った ABCM 培地 100 mL に前培養液を 1 mL 入れ、嫌気条件下にて 24 時間培養した。培養後、培養液を 50 mL チューブ (IWAKI 製) に分注し、遠心機 (トミー精工製 MX-300) で 4000 rpm、10 分、4°C で遠心分離した。遠心分離後、上清を 300 mL ビーカーに回収した。回収した培養液上清の pH を pH メーター (HORIBA 製) で確認しながら 5N NaOH を添加して pH 7.2 に調製した。滅菌乾燥済みの 100 mL 試薬瓶に取り付けた Φ 0.22 µm のフィルター (IWAKI 製) を真空ポンプで引いて通すことでフィルター滅菌を行った。その後、室温で保管した。使用時は、20× ABCM 培地と 100 mg/mL の Amp 溶液をそれぞれ終濃度 0.5× と 100 µg/mL になるよう添加した。

また熱処理した CM の調製は上記で調製した CM をオートクレーブ (トミー精

工製 LSX-300)にて 100°C で 10 分間処理することで行った。

2-8. 透過型電子顕微鏡による細菌細胞の観察

観察したい細菌培養液と 1% PTA を観察する直前に等量ずつ 1.5 mL のチューブ内で混合し、その混合液 10 μ L を観察用グリッド(日新 EM 製コロジオン膜貼付メッシュ)上に玉になるように乗せ、その状態で 1~2 分間静置した。次に、紙ウエス(日本製紙クレシア製キムワイプ)でグリッド中心から一気に水気を吸い取った後、数分静置して乾燥させる。観察用グリッド表面のコロジオン膜は破れやすいことから、扱いは精密ピンセットにて慎重に行った。

TEM(日立製 H-7650)のグリッド台に準備した試料グリッドを固定し、そのグリッド台ごと TEM の試料台にセットして観察を行った。電子線の加速電圧は 100 kV で行った。

2-9. PPT クローンの作製

PPT クローンは 904 種類の大腸菌プロモーターが GFP をレポーター遺伝子として持つ pGRP ベクターにクローン化されたセットである。この PPT クローンの大腸菌形質転換体を用いることにより大腸菌のプロモーター発現を GFP の蛍光により間接的に測定できる。以下は大腸菌遺伝子プロモーターを pGRP ベクターにクローニングする一般的な流れである(Fig. 4)。

まず大腸菌 W3110 ゲノム上のクローニングしたい大腸菌プロモーター領域を PCR によって増幅した。0.2 mL のチューブに鋳型となる DNA 溶液を終濃度 0.5 ng/ μ L、10 $\times$ EX taq buffer (Takara 製)を終濃度 1 $\times$ 、2.5 mM dNTP を終濃度 0.2 mM、増幅したい大腸菌プロモーター領域に相補的に結合する 100 mM の forward と reverse の 2 種類のプライマー(Table S1)を終濃度 0.5 mM、5 U/ μ L の EX taq(Takara 製)を終濃度 0.025 U/ μ L で混合し、ddH₂O により全容量が 100 μ L となるよう調製した。このチューブを PCR 装置(Applied Biosystems 製)に入れ PCR を行った。PCR の条件はまず 95°C で 5 分の加熱を行い、次に 95°C、50°C、72°C の 3 温度を各 30 秒で 30 サイクル、72°C で 1 分、最後に 10°C に温度を下げて終了した。PCR 産物は使用するまで-30°C で凍結保存した。

PCR 後、反応溶液をアガロースゲル電気泳動にかけ、目的の DNA 断片が増幅できているか確認した。まず 1% アガロースゲルを作製した。電気泳動用特級試薬アガロース(ナカライテスク)を 1 $\times$ TAE に 1%になるよう加え、電子レンジで溶解した。約 50°C まで冷却後、電気泳動装置(Mupid-2 plus)に付属している鋳型に流し込んだ。流し込んだら素早くコームを刺し、その状態で 30 分以上静置して完全に固化させた。完全に固化してからコームを左右均等な力でゆっく

り引き抜いた。次に完成したゲルを電気泳動槽に置き、ゲル表面が覆われるまで1×TAEを注いだ。コームでつくったウェルをマイクロピペットで洗浄した後、ウェルにDNA溶液5 µLと試料溶液の6分の1容量となるBPB溶液1 µLを混合した計6 µLを添加した。また試料を入れた隣の試料溝にDNAサイズマーカーとして50 ng/µLのλ/HindIIIを2 µLを添加した。泳動装置に電源をつなぎ、100Vで泳動を開始しBPB溶液のバンドがゲルの3分の2程度まできたところで泳動を止めた。泳動後、アガロースゲルをEtBr溶液で5分間染色し、その後、FAS-III (TOYOBO製)にて紫外線を照射してDNA及びRNA断片に入り込んだEtBrの蛍光を検出した。

アガロース電気泳動によってDNAの増幅が確認できたDNA溶液に対しPhOH抽出とEtOH沈殿を行い、DNAを精製した。DNA溶液の容量に対して1/2容量のTE飽和PhOHとクロロホルムを加えvortex mixerで激しく攪拌し、遠心機で12000 rpm、1分、4°Cで遠心分離し水相を回収した。回収した水相の容量に対しクロロホルムを等量加えvortex mixerで激しく攪拌し遠心機で12000 rpm、1分、4°Cで遠心分離して水相を回収した。この水相の容量に対し1/10量の3 M NaOAcと2.5倍量のEtOHを加えvortex mixerで20秒以上激しく攪拌し、遠心機で14000 rpm、15分、4°Cで遠心分離してDNAを沈殿させ上清をアスピレーターで除去した。次に70% EtOHを100 µL 静かに加えて遠心機で14000 rpm、5分、4°Cで遠心分離してDNAを沈殿させ上清を除去し、遠心濃縮装置(TAITEC製 VC-15SP)にて2~5分間乾燥させた。乾燥後、使用するまで-30°Cで凍結保存した。

精製したDNA断片とpGRPの両端を制限酵素によって切断した。制限酵素はpGRPのクローニングサイトの両端となる、BglIIとEcoT22I(Takara製)を用いた。精製したDNAを178 µLのddH₂Oに溶解し、使用する制限酵素に付属する10× H bufferを終濃度1×となるよう20 µL加え静かに混合した。この溶液にBglIIとEcoT22Iの制限酵素溶液をそれぞれ1 µL添加しマイクロピペットで混合し37°Cの恒温槽で1時間反応させた。pGRPの制限酵素処理は3時間行った。BglIIとEcoT22Iは同じ10× H bufferで活性を得るため2種類の制限酵素処理を同時に行えた。反応後PhOH抽出とEtOH沈殿にてDNAを精製した。DNA溶液の容量に対して1/2容量のTE飽和PhOHとクロロホルムを加えvortex mixerで激しく攪拌し、遠心機で12000 rpm、1分、4°Cで遠心分離し水相を回収した。回収した水相の容量に対しクロロホルムを等量加えvortex mixerで激しく攪拌し遠心機で12000 rpm、1分、4°Cで遠心分離して水相を回収した。この水相の容量に対し1/10量の3 M NaOAcと2.5倍量のEtOHを加えvortex mixerで20秒以上激しく攪拌し、遠心機で14000 rpm、15分、4°Cで遠心分離してDNAを沈殿させ上清をアスピレーターで除去した。次に70% EtOHを100 µL 静かに加えて遠心機で

14000 rpm、5 分、4°C で遠心分離して DNA を沈殿させ上清を除去し、遠心濃縮装置(TAITEC 製 VC-15SP)にて 2~5 分間乾燥させた。精製した DNA 溶液は-30°C で凍結保存した。

制限酵素処理した DNA 断片と pGRP をライゲーションした。pGRP に 10 μ L の ddH₂O に溶解した精製 DNA 断片溶液 4 μ L と 50~100 ng/ μ L pGRP を 1 μ L 混合し、そこに DNA Ligation Kit <Mighty Mix>(Takara 製)の Ligation mix を 5 μ L 添加し、ピペティングで静かに混合し、16°C の恒温槽で 30 分~16 時間反応させた。

ライゲーション後は直ちに DH5 α に形質転換を行った。その為、事前に DH5 α コンピテントセルを作製した。コンピテントセルを作製する大腸菌 DH5 α を 5 mL の LB 培地にて好気条件下の 37°C で一晩前培養した。次に前培養液を新たに準備した LB 培地 10 mL に 100 μ L 加えて植菌し本培養を好気条件下の 37°C で行った。培養液の濁度 OD₆₀₀ が 0.2~0.3 になるまで培養した後、培養液を 15 mL のチューブ(IWAKI 製)に移し、遠心機で 4000 rpm、20 分、4°C で遠心分離し菌を沈殿させ上清を除去した。沈殿した菌を 1 mL の 0.1 M CaCl₂ · 2H₂O で懸濁し 1.5 mL のチューブに移した上で氷上に 10 分間おいた。その後、遠心機で 15000 rpm、5 分、4°C で遠心分離し菌を沈殿させ上清を除去したところに 200 μ L の 0.1 M CaCl₂ · 2H₂O と 130 μ L の 60% Glycerol を加えピペティングで穏やかに混合した。新しい 1.5 mL のチューブ 2 本に 100 μ L ずつ分注し、残りを抗生物質の添加された LB 寒天培地に塗布して好気条件下の 37°C で培養することでコンタミしていないかのチェックを行った。

形質転換はまず、-80°C で冷凍されている形質転換を行うコンピテントセルの入った 1.5 mL のチューブを氷上に置きゆっくり解凍した。解凍したコンピテントセルに形質転換するプラスミド溶液を 50 ng 分加え、ピペティングで静かに混合し氷上で 10 分間静置した。次に 42°C の恒温槽に 45 秒間さらしヒートショックを行い、直ちに 1 mL の LB 液体培地を加え 37°C の恒温槽で 30 分程度培養した。培養後、遠心機で 12000 rpm、5 分、4°C で遠心分離し菌を沈殿させた。約 1.1 mL の培養上清のうち 0.9 mL を除去して、残った培養上清で沈殿した菌を懸濁して 100 μ g/mL の Amp を含む LB 寒天培地に塗布し好気条件下の 37°C で一晩培養しコロニーを形成させた。

コロニーを形成した形質転換体に目的の DNA 断片が挿入されているかを確認する為にコロニーPCR を行った。0.2 mL のチューブに 10 $\times$ EX taq buffer (Takara 製)を終濃度 1 $\times$ 、2.5 mM dNTP を終濃度 0.2 mM、Anti-EGFP プライマーを終濃度 0.5 mM、5 U/ μ L の EX taq(Takara 製)を終濃度 0.025 U/ μ L で混合し、ddH₂O により全容量が 10 μ L となるようにした。次に、試料となるプラスミドを保持している大腸菌の寒天培地上のコロニーを滅菌した爪楊枝でピックアップし、

上記で準備した 0.2 mL のチューブに懸濁した。また、その爪楊枝で 100 µg/mL の Amp を含む新たな LB 寒天培地にスポットしコロニーを複製した。コロニーを懸濁した 0.2 mL のチューブを PCR 装置(Applied Biosystems 製)に入れ PCR を行った。PCR の条件はまず 95°C で 5 分の加熱を行い、次に 95°C, 50°C, 72°C の 3 温度を各 30 秒で 30 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分反応させ、10°C に温度を下げて終了した。PCR 後、反応溶液を 1% アガロースゲル電気泳動にかけ、目的の DNA 断片が増幅できているか確認した。

コロニー PCR にて LB 寒天培地にスポットしたコロニーから抽出したいプラスミドを保持している大腸菌を LB 培地 5 mL に植菌し好気条件化の 37°C で一晩培養した。培養後、培養液 2 mL を 2 mL チューブに入れ、遠心機で 12000 rpm、5 分、4°C で遠心分離し菌を沈殿させ上清を除去した。この 2 mL のチューブに再び 2 mL の培養液を入れ同様に遠心分離し菌を沈殿させ上清を除去した。洗菌するため沈殿に 1 mL の ddH₂O を加え懸濁して再度同条件で遠心分離し菌を沈殿させ上清を除去した。ここからは QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen 製)を使用し抽出した。以降の試薬は全て Kit 付属品の試薬である。沈殿している菌を Buffer P1 を 250 µL 加え懸濁した。次に Buffer P2 を 250 µL 加え転倒混和し、続けて Buffer N3 を 350 µL 加え転倒混和した。その後、遠心機で 14000 rpm、15 分、4°C で遠心分離し上清を Kit 付属のカラムである Spin column に全量移した。このカラムを遠心機で 14000 rpm、1 分、4°C で遠心分離しカラムを透過してきた溶出液を除去し、次にカラムに Buffer PB を 500 µL 加え同様に遠心分離して溶出液を除去し、Buffer PE を 750 µL 加え同様に遠心分離して溶出液を除去した。さらに空のカラムを再度遠心分離しカラム中に残っている溶液を完全に飛ばした。最後に、Buffer EB を 50 µL 加え遠心機で 14000 rpm、1 分、4°C で遠心分離しカラムからプラスミド DNA を溶出させた。溶出させた溶液の DNA の濃度を分光光度計(GE ヘルスケア製 NanoVue Plus)にて 260 nm の吸光度を測定することで算出した。また抽出したプラスミド溶液は -30°C で凍結保存した。

DNA シーケンサーによって挿入塩基配列をシーケンスする為、抽出したプラスミドを鋳型として PCR を行った。PCR は 0.2 mL チューブに、鋳型 DNA を 250 ng、鋳型 DNA に相補的なプライマー 1 種類を終濃度 0.25 pmol/ mL、BigDye[®] Terminator v3.1 Kit の Matrix Standards (Applied biosystems 製)を 0.5 µL、同 Kit の 5× Sequencing Buffer を終濃度 1×を入れ、ddH₂O にて全容量を 20 µL となるよう調製した。このチューブを PCR 装置(Applied Biosystems 製)に入れ PCR を行った。PCR の条件は 95°C を 20 秒、50°C を 15 秒、60°C を 1 分の 3 温度を 25 サイクル行った。PCR 後、反応液を 1.5 mL チューブに全量移してから Sodium acetate buffer(1.5 M NaOAc pH > 8.0, 250 mM EDTA の混合溶液)を 2 µL、EtOH を 60 µL 加え vortex mixer で攪拌し、遠心機で 14000 rpm、20 分、4°C で遠心分離し DNA

を沈殿させ上清を除去した。次に 70% EtOH を 60 μ L 加えてから遠心機で 14000 rpm、5 分、4°C で遠心分離し DNA を沈殿させ上清を除去し、遠心濃縮装置にて 2~5 分間乾燥させた。乾燥後、Hi-Di™ Formamide(Applied Biosystems 製)を 15 μ L 加え DNA を溶解した。DNA シーケンサーは 3130xl ジェネティックアナライザシーケンシングシステム(Applied Biosystems 製)を用い、調製したサンプルのシーケンスを確認した。

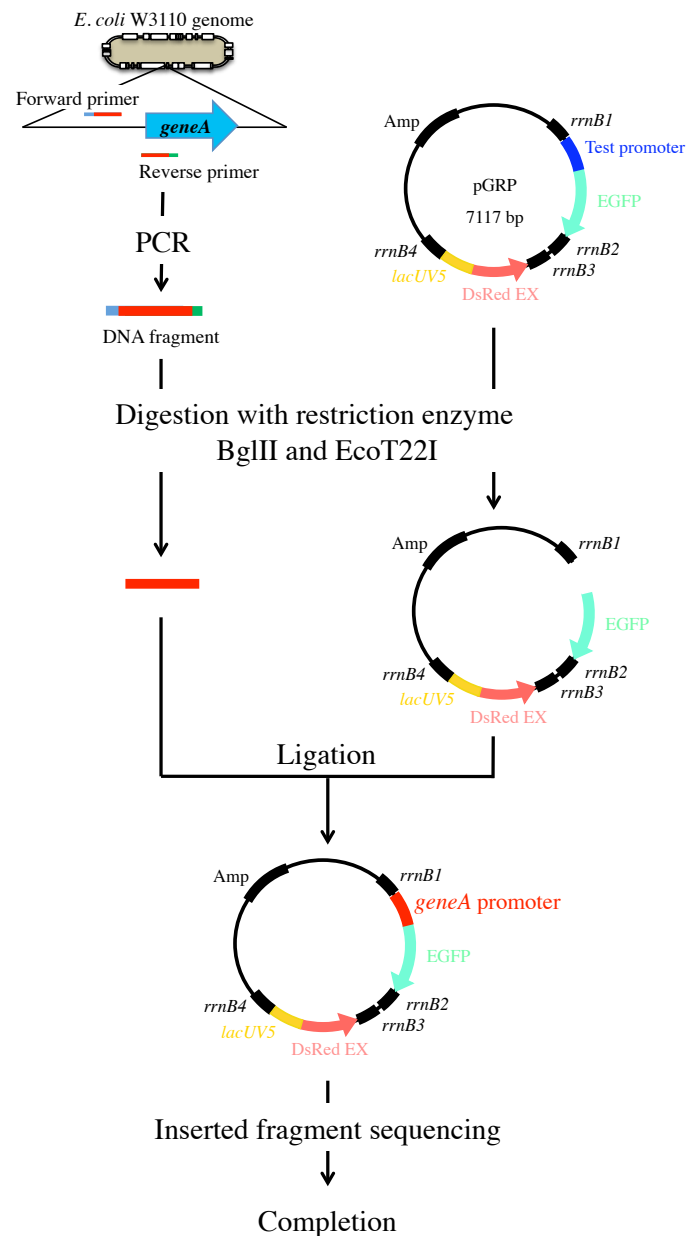


Fig. 4. PPT クローン作製概略図

E. coli W3110 genome から増幅したターゲット遺伝子のプロモーター断片を pGRP ベクターに挿入し、EGFP 融合遺伝子を作製した。

2-10. 蛍光プレートリーダーによる大腸菌細胞内の GFP 蛍光強度の測定

2-10-1. BioTek 製 FL600 による GFP 蛍光強度の測定

96 穴平板プレートの各ウェルに入れた培養液 200 μ l を BioTek 製蛍光プレートリーダー PL600 にて緑色蛍光強度を測定した。測定は、蛍光感度 255、励起光 485 nm、検出光 525 nm の条件で行った。

2-10-2. コロナ電気製 MTP-880 による GFP 蛍光強度の測定

96 穴平板プレートの各ウェルに入れた培養液 200 μ l をコロナ電気製蛍光プレートリーダー MTP-880 にて緑色蛍光強度を測定した。測定は励起光 490 nm、検出光 530 nm、蛍光感度 $\times 10$ の条件で行った。また OD₆₀₀ による濁度測定も行った。

2-11. フローサイトメトリーによる大腸菌細胞内の GFP 蛍光強度の測定

測定する細菌培養液をフローサイトメトリー用のチューブに移し、日本 BD 製フローサイトメトリー FACS Calibur を用いて各培養液の緑色蛍光強度を測定した。測定では光源である 488 nm アルゴンレーザーにより励起し、530 nm の蛍光を検出した。また検出する際の蛍光感度は野生株である *E. coli* W3110 をネガティブコントロールとしてヒストグラムの蛍光強度のピークが 10^1 の位置になるよう調節した。またポジティブコントロールとして pGRH313 を形質転換した大腸菌を用いた。

2-12. PPT クローンを用いたプライマー伸長法による転写開始点の決定

転写開始点を決定するプロモーターを含む PPT クローンの形質転換体を含む細菌培養液 20~30 mL から total RNA の抽出を行った。培養液を 50 mL チューブ（IWAKI 製）に移し、遠心機で 4000 rpm、20 分、4°C で遠心分離し菌を沈殿させ上清を除去した。沈殿した菌に Solution A を 1 mL 加え懸濁し、次に H₂O 飽和 PhOH を 1 mL 加え vortex mixer で激しく攪拌した。その後すぐに 60°C の恒温槽に入れ、5 分間震とうしながら保温した。次に 50 mL チューブ内の全量約 2 mL を 2.0 mL チューブに移し、遠心機で 13000 rpm、3 分、4°C で遠心分離し、上清 900 μ L を 1.5 mL のチューブに移し、再度同条件で遠心分離した。遠心分離後、上清を 400 μ L ずつ新しい 1.5 mL のチューブ 2 本に移し、1 mL の EtOH を加え vortex mixer で 20 秒以上激しく攪拌して遠心機で 13000 rpm、3 分、4°C で遠心分離した。上清をアスピレーターで除去したところに 70% EtOH を 1 mL 静かに加えて遠心機で 13000 rpm、3 分、4°C で遠心分離し上清をマイクロピペットで除去して遠心濃縮装置にて完全に乾燥させない程度にアルコール分を蒸発させ

た。次に2本のチューブの沈殿を98 μL の0.1% DEPC waterで溶解し1本にした。そこにDNase I(Takara 製)に付属する10 $\times$ DNase I Bufferを10 μL 、5 U/mL DNase I(Takara 製)を1 μL 加え混合し室温で1時間DNA分解処理を行った。1時間後、 H_2O 飽和 PhOHを100 μL 加え転倒混和により酵素処理反応を止め、遠心機で13000 rpm、3分、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離し水相約を100 μL を300 μL のSolution Aが入った1.5 mLのチューブに移した。そこに1 mLのEtOHを加え転倒混和で混合してから遠心機で13000 rpm、3分、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離し上清をアスピレーターで除去した。そこに70% EtOHを1 mL 静かに加えて遠心機で13000 rpm、3分、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離し上清をマイクロピペットで除去した。その後、遠心濃縮装置にて完全に乾燥させない程度にアルコール分を蒸発させた。最後に20~30 mLの0.1% DEPC waterに溶解し、RNAの濃度を分光光度計(GEヘルスケア製 NanoVue Plus)にて260 nmの吸光度を測定することで算出した。次に算出した濃度を基にRNA 2 μg 分を0.8%アガロース電気泳動で泳動しRNA量の確認を行った。その為に0.8%アガロースゲルを作製した。電気泳動用特級試薬アガロース(ナカライテスク)を1 $\times$ TAEに0.8%になるよう加え、電子レンジで溶解した。約50 $^{\circ}\text{C}$ まで冷却後、電気泳動装置(Mupid-2 plus)に付属している鋳型に流し込んだ。流し込んだら素早くコームを刺し、その状態で30分以上静置して完全に固化させた。完全に固化してからコームを左右均等な力でゆっくり引き抜いた。次に完成したゲルを電気泳動槽に置き、ゲル表面が覆われるまで1 $\times$ TAEを注いだ。コームでつくったウェルをマイクロピペットで洗浄した後、ウェルにtotal RNA溶液2 μg 分とその試料溶液の6分の1容量のBPB溶液1 μL を混合して添加した。また試料を入れた隣の試料溝にDNAサイズマーカーとして50 ng/ μL の λ /HindIIIを2 μL を添加した。泳動装置に電源をつなぎ、100Vで泳動を開始しBPB溶液のバンドがゲルの3分の2程度まできたところで泳動を止めた。泳動後、アガロースゲルをEtBr溶液で5分間染色し、その後、FAS-III(TOYOBO 製)にて紫外線を照射してDNA及びRNA断片に入り込んだEtBrの蛍光を検出した。検出したribosomal RNAのバンドの濃さからRNAの濃度と純度を確認した。また使用するまで-30 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

0.8%アガロース電気泳動によって濃度の確認ができたtotal RNAに対し、逆転写反応を用いてPPTクローン由来のmRNAのcDNAを合成した。逆転写反応系は40 μg 分のtotal RNAに対しPrimeScript[®] Reverse Transcriptase(Takara 製)に付属の5 $\times$ PrimeScript Bufferを3 μL 、Recombinant RNase Inhibitor(Takara 製)を0.75 μL 、1 pmol/ μL のcDNAを合成したいmRNAに相補的なプライマーを1.5 μL 、2.5 mM dNTPを12 μL 、40 U/ μL のPrimeScript[®] Reverse Transcriptaseを0.2 μL (8 U分)を混合しddH₂Oにて全量を30 μL として行った。まずReverse Transcriptase以外の試薬を1.5 mLのチューブ内で混合した後、60 $^{\circ}\text{C}$ のヒートブロック(IWAKI

製 ALB-221)にて 30 分間加熱し高次構造をとっている RNA を一本鎖にした。加熱後 45°C の恒温槽にチューブを移しプライマーをアニーリングさせつつ 30 分間温度が下げ保温した。温度が下がったところに Reverse Transcriptase を添加し、そのまま 45°C の恒温槽で 2 時間逆転写反応させた。反応後、PhOH 抽出と EtOH 沈殿で合成した cDNA を精製した。cDNA 溶液の容量に対して等量の TE 飽和 PhOH を加え vortex mixer で激しく攪拌し、遠心機で 12000 rpm、1 分、4°C で遠心分離し水相を回収した。この水相の容量に対し 1/10 量の 3 M NaOAc と 2.5 倍量の EtOH を加え vortex mixer で 20 秒以上激しく攪拌し、遠心機で 14000 rpm、15 分、4°C で遠心分離して DNA を沈殿させ上清をアスピレーターで除去した。次に 70% EtOH を 100 μ L 静かに加えて遠心機で 14000 rpm、5 分、4°C で遠心分離して DNA を沈殿させ上清を除去し、遠心濃縮装置(TAITEC 製 VC-15SP)にて 2~5 分間乾燥させた。その後、-30°C で凍結保存した。また使用前に ddH₂O を 3 μ L、Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (GE ヘルスケア製)付属の Red Loading dye を 1.5 μ L 加え vortex mixer で混合し、90°C のヒートブロックにて 3 分間加熱したものを cDNA 試料とした。

次にプライマー伸長法で転写開始点を決定したい *gfp* 遺伝子上流の DNA 配列の塩基 A、T、G、C、のシーケンスラダーを Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (GE ヘルスケア製)を用いて作製した。鋳型となる PPT クローンのプラスミド DNA 50~250 ng に対し、その DNA に相補的なプライマーを 1 pmol、Kit 付属の A reagent を 2 μ L 混合し ddH₂O にて全量を 8 μ L にした。同様に A reagent を T reagent、G reagent、C reagent に置き換えたモノも調製した。その後これらを PCR にかけた。PCR の条件はまず 95°C で 5 分の加熱を行い、次に 95°C を 20 秒、50°C を 15 秒、60°C を 1 分の 3 温度を 25 サイクル行い、最後に 10°C に温度を下げて終了した。この PCR 産物は -30°C で凍結保存した。また使用前に上記 Kit 付属の Red Loading dye を 5 μ L 加え vortex mixer でよく混合し、90°C のヒートブロックにて 3 分間加熱したものをシーケンスラダー試料とした。

最後に調製した cDNA 試料とシーケンスラダーの試料を 8% PAGE によって展開した。その為にまず、8% のアクリルアミドゲルを作製した。ゲルを作る為の DNA-ケンサー(SHIMADZU 製 DSQ-500)付属のガラス板を水道で中性洗剤を用い洗浄し ddH₂O でリンスした。十分に水気を拭き取った後イソプロパノールで再度ゲル板両面を拭いた。ゲル板の両サイドにスペーサーを噛ましてゲル板を組み立て、ゲル板の上部以外をビニールテープで密閉し、さらにゲル板の両サイド全部を大きめクリップで止めた。次に GENE-PAGE PLUS™ 8%, EZ SQUEEZE™ (AMRESCO 製)を 14 mL とり 50 mL ビーカーに入れ、付属の 2 種類の重合開始剤を加え 2 分間攪拌し、ゲルが固化しないよう素早く 0.45 μ m のフィルターで濾過してゴミを取り除き 2 枚のゲル板の隙間に流し込んだ。このとき

空気が入らないように一気に流し込んだ。ゲル版の上部までゲルが満たされたらコームを逆さまに刺してゲル上部を平らにした。その後ゲル板を倒して置き、ゲル板上部に乾燥防止のためラップをかけた上で、ゲル板に重しを乗せてゲルが固まるまで 3 時間静置した。ゲル固化後、ゲル板からコーム、クリップ、ビニールテープを外し、水道水で表面などについているゲルのクズを洗い流した。特にコームを刺していた試料溝は入念に洗い流した。その後、ddH₂O でリンスし、水気を拭き取ったら再度イソプロパノールでゲル板両面を拭いた。ゲル板両面にホコリ等が付着していないことを確認してから DNA シーケンサー (SHIMADZU 製 DSQ-500) にセットした。

次に試料を泳動して展開した。蛍光自動 DNA 分析装置 (SHIMADZU 製 DSQ-500) にセットしたゲル板の上下 2 つの泳動槽に泳動用バッファーである 1.2 × TBE を試料溝が沈むまで注いだ。試料溝を作るためコームのギザギザしている側をゲルに刺し、泳動を行う試料をコームのギザギザのすき間に 1.5~3 μL 入れた。電圧 100 V で 4 分間泳動し試料をゲル中に導入した後、コームを抜き去り、その後電圧 1000 V で 5 時間電気泳動を行った。その後、cDNA とシーケンサダーのバンドの位置の比較から転写開始点を決定した。

第3章 結果

3-1. 大腸菌 W3110 と各種ビフィズス菌の形態、生育及びコロニー形成

3-1-1. 形態

大腸菌とビフィズス菌の細胞の形態を確認する為、透過型電子顕微鏡にて細菌細胞を観察した。大腸菌 W3110、ビフィズス菌 *B. adolescentis*、*B. angulatum*、*B. bifidum*、*B. catenulatum*、*B. kashiwanohense*、*B. longum*、*B. pseudocatenulatum*、*B. pseudolongum*、*B. scardovii* をそれぞれ 5 mL の ABCM にて窒素嫌気条件下で一晩培養し、その培養液を PTA によりネガティブ染色したものを TEM にて観察した(Fig. 5)。

その結果、大腸菌 W3110 は概ね長径が約 2 μm 、短径が約 1 μm の桿菌の形状を保っていた。さらに高倍率では鞭毛も確認できた。また大腸菌細胞はそのほとんどが同じ程度の大きさであり、ばらつきが少なかった。

ビフィズス菌 *B. adolescentis* は、不定形の桿菌であるため、大腸菌のようなきれいな桿菌の形をしておらず、長径が長く細長い細胞から球形に近い細胞までさまざまな形態をとっていた。また細胞の内部に黒の濃い部分が、細胞表面の一部に明るい白色に見える部分が観察された。これらはそれぞれ PTA によるネガティブ染色で強く染色された、または染色されなかった部位だと考えられるがなぜこのように染色されたかは不明である。

ビフィズス菌 *B. angulatum* は細胞サイズが概ね長径 5 μm 、短径 1.5 μm と他のビフィズス菌種に比べ大きく、また安定した桿菌の形態をしていた。

ビフィズス菌 *B. bifidum* は大腸菌 W3110 と同様に概ね長径が約 2 μm 、短径が約 1 μm の桿菌の形状を保っていた。

ビフィズス菌 *B. catenulatum* は概ね長径 1 μm 、短径 0.5 μm 程度と他のビフィズス菌と比べ細胞サイズが小さく、桿菌の形態はしているがその細菌細胞表面は波打っているのが観察された。また細胞の両極付近に黒の濃い部分が観察された。この黒い部分は PTA により強く染色されていることが考えられるが、なぜこのように染色さるのかは不明である。

ビフィズス菌 *B. kashiwanohense* は細胞サイズについては大腸菌 W3110 と同様に概ね長径 2 μm 、短径 1 μm 程度であったが安定した桿菌の形態をしておらず、折れ曲がった形状をとるなど不定形であった。また細胞の両極付近に黒の濃い部分が観察された。この黒い部分は *B. adolescentis* と同様 PTA により強く染色されていることが考えられる。

ビフィズス菌 *B. longum* は概ね長径 1 μm 、短径 0.5 μm 程度と他のビフィズス菌と比べ細胞サイズが小さい。また細胞の形態は、安定した桿菌の形状、折れ

曲がった形状、Y 字に枝分かれしている形状と非常に多彩であった。また高倍率での観察で細胞表面は滑らかでなく凸凹している様子が観察された。

ビフィズス菌 *B. pseudocatenulatum* は大腸菌 W3110 と同様に概ね長径 2 μm 、短径 1 μm 程の細胞サイズであり、細胞の極側では枝分かれの様に細胞が伸びているのが観察された。また細胞側面の一部に明るい白色に見える部分が観察された。これらはそれぞれ PTA によるネガティブ染色で強く染色された、または染色されなかった部位だと考えられるがなぜこのように染色されたかは不明である。

ビフィズス菌 *B. pseudolongum* は大腸菌 W3110 と同様に概ね長径 2 μm 、短径 1 μm 程の細胞サイズであった。安定した桿菌の形態の細胞が多く観察されたが、ところどころ折れ曲がっている細胞も観察された。

ビフィズス菌 *B. scardovii* は大腸菌 W3110 同様長径 2 μm 、短径 1 μm 程の細胞サイズであった。細胞の形態は他の多くのビフィズス菌同様、不定形で様々な形状が観察された。また細胞表面に凹凸が観察され、細胞側面の一部には明るい白色に見える部分が観察された。

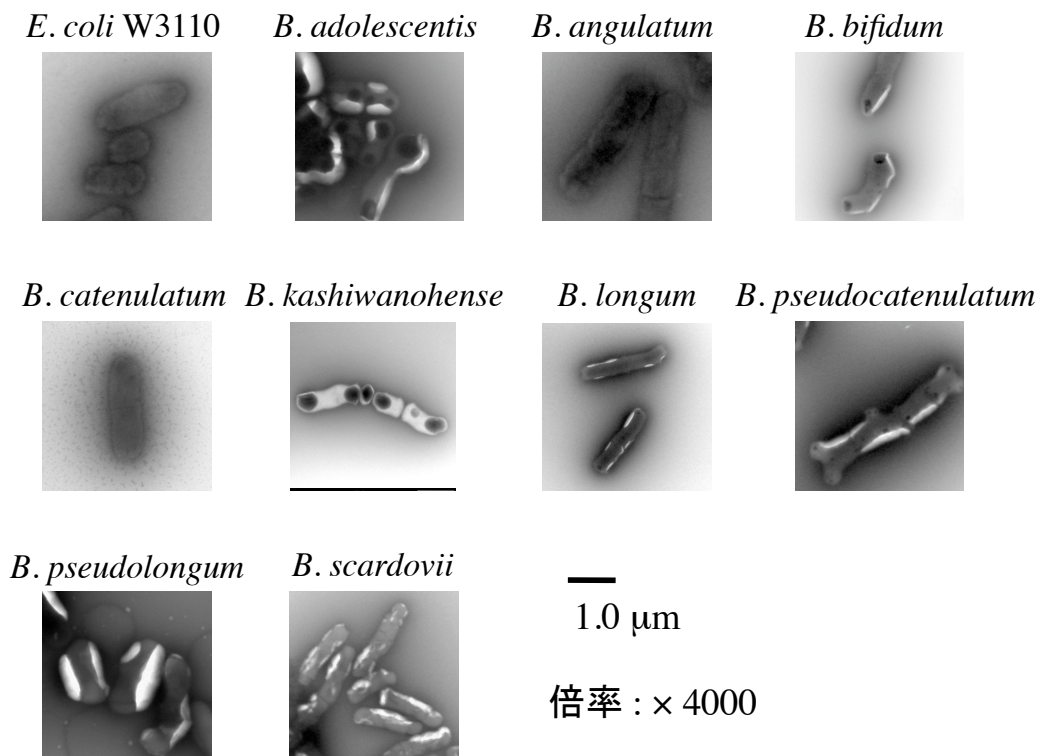


Fig. 5. 大腸菌 W3110 及び各ビフィズス菌の TEM 写真

大腸菌が典型的な桿菌の形状をしているのに対し、ビフィズス菌は不定形を示した。また、ビフィズス菌は PTA のネガティブ染色で染色されず、画像としては強い白色を示す部位が観察された。

3-1-2. 増殖曲線と培養液 pH

大腸菌 W3110 と各種ビフィズス菌 *B. adolescentis*、*B. angulatum*、*B. bifidum*、*B. catenulatum*、*B. dentium*、*B. kashiwanohense*、*B. longum*、*B. pseudolongum*、*B. scardovii*、*B. sp.* HM5-2 が ABCM 培地でどのように増殖するのかを調べるため、各菌の増殖曲線と培養液の pH の変化を調べた。窒素嫌気条件下で一晩全培養した各菌の培養液を ABCM 培地 5 mL に 50 μ L 植菌して 24 時間経時的に測定した。

その結果、大腸菌 W3110 は植菌してからすぐに対数的に増殖し培養 5 時間を超えた時点で定常期に入った。その後培養 24 時間での OD₆₀₀ は 0.909 であった。また培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は菌の増殖速度と相関しており、対数増殖期に大きく低下した。定常期初期には pH は 5 まで低下したが、定常期後期の 24 時間後には pH は 6 付近まで上昇した。この大腸菌の増殖曲線と培養液 pH を基準とし、ビフィズス菌の増殖曲線と培養液 pH を比較した。

ビフィズス菌 *B. adolescentis* は大腸菌と比べ増殖速度が遅く、大腸菌よりも 5 時間長い培養 10 時間で定常期に達した。培養 24 時間での OD₆₀₀ は大腸菌とほとんど変わらない 0.930 であった。また培養液 pH は細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は菌の増殖速度と相関しており、対数増殖期に大きく低下した。その後定常期に pH 5 まで低下した。

ビフィズス菌 *B. angulatum* は大腸菌と比べ培養 2 時間を超えたあたりから増殖が一度停滞した。その後大腸菌と比べ 5 時間長い培養 10 時間で定常期に達し、培養 24 時間での OD₆₀₀ は大腸菌とほとんど変わらない 1.049 であった。また培養液 pH は細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は菌の増殖速度と相関しており、対数増殖期に大きく低下した。その後培養 24 時間で pH 4 まで低下した。

ビフィズス菌 *B. bifidum* は大腸菌と比べ植菌直後から増殖速度は遅かったが、培養 24 時間までほぼ対数的に増殖した。培養 24 時間での OD₆₀₀ は大腸菌と大きくは変わらず 0.745 であった。また培養液 pH は細菌の増殖に伴い低下し、培養 24 時間で pH 5 まで低下した。

ビフィズス菌 *B. catenulatum* は大腸菌と同様に植菌後すぐに対数的に増殖したが培養 4 時間を超えたあたりから大腸菌に比べ多少増殖速度が低下した。その後、培養開始 10 時間で定常期に達し、培養 24 時間での OD₆₀₀ は大腸菌とほとんど変わらない 0.865 であった。また培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は菌の増殖速度と相関しており、対数増殖期に大きく低下した。その後定常期初期に pH 5 まで低下し pH も定常となった。

ビフィズス菌 *B. dentium* は大腸菌と同様に植菌直後から対数的に増殖し、培養 9 時間程度で定常期に達した。定常期に達した際の OD₆₀₀ の値は 1.150 であり、大腸菌よりも高くなった。その後培養 24 時間で OD₆₀₀ は大腸菌に比べて高い

1.501 まで上昇した。また培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は菌の増殖速度と相関しており、対数増殖期に大きく低下した。その後定常期初期に pH 5 まで低下し、培養 24 時間で pH 4 になった。

ビフィズス菌 *B. kashiwanohense* は培養 4 時間まではほとんど増殖しなかった。この 4 時間は誘導期であると考えられる。その後、対数増殖期に入り大腸菌とほぼ同様の増殖速度で増殖し、培養 10 時間程で定常期に達した。その後、培養 24 時間での OD₆₀₀ は大腸菌とほとんど変わらない 0.993 であった。また培養液 pH は細菌の増殖に伴い低下し、培養 24 時間で pH 5 まで上昇した。

ビフィズス菌 *B. longum* は大腸菌と同様に植菌直後は対数的に増殖したが、培養 4 時間を超えたあたりから大腸菌に比べ増殖速度が低下した。その後、培養 8 時間で定常期に達し、24 時間での OD₆₀₀ は大腸菌とほとんど変わらない 0.860 であった。また培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は菌の増殖速度と相関しており、対数増殖期に大きく低下した。その後定常期初期に pH 5 まで低下し pH も定常となった。

ビフィズス菌 *B. pseudolongum* は大腸菌と比べ非常に増殖速度が遅く、培養 5 時間でも OD₆₀₀ が 0.5 に満たなかった。しかしその後徐々に増殖していき、培養 24 時間での OD₆₀₀ は大腸菌とほとんど変わらない 1.001 まで上昇した。また培養液 pH は細菌の増殖に伴い低下し、培養 24 時間で pH 5 まで低下した。

ビフィズス菌 *B. scardovii* は大腸菌と比べ培養 2 時間を超えたあたりから増殖が一旦停滞した。その後大腸菌と比べ 4 時間ほど長い培養 9 時間で定常期に達し、培養 24 時間での OD₆₀₀ は大腸菌とほとんど変わらない 0.902 であった。また培養液 pH は細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は菌の増殖速度と相関しており、対数増殖期に大きく低下した。さらに培養液は pH 4 まで一旦は低下したが、24 時間で pH 5 まで上昇した。

ビフィズス菌 *B. sp. HM5-2* は培養 3 時間までは全く増殖しなかった。この 3 時間は誘導期であると考えられる。その後、対数増殖期に入り大腸菌とほぼ同様の増殖速度で増殖し、培養 7 時間程で定常期に達した。その後、培養 24 時間での OD₆₀₀ は大腸菌とほとんど変わらない 0.901 であった。また培養液 pH は細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は菌の増殖速度と相関しており、対数増殖期に大きく低下した。また定常期後期にも培養液 pH が低下し、培養 24 時間で pH 5 となった。

以上の結果から大腸菌 W3110 と似たような増殖曲線を示したビフィズス菌株は *B. adolescentis*、*B. angulatum*、*B. catenulatum*、*B. dentium*、*B. kashiwanohense*、*B. longum*、*B. scardovii*、*B. sp. HM5-2* の 7 種類であった(Fig. 6)。

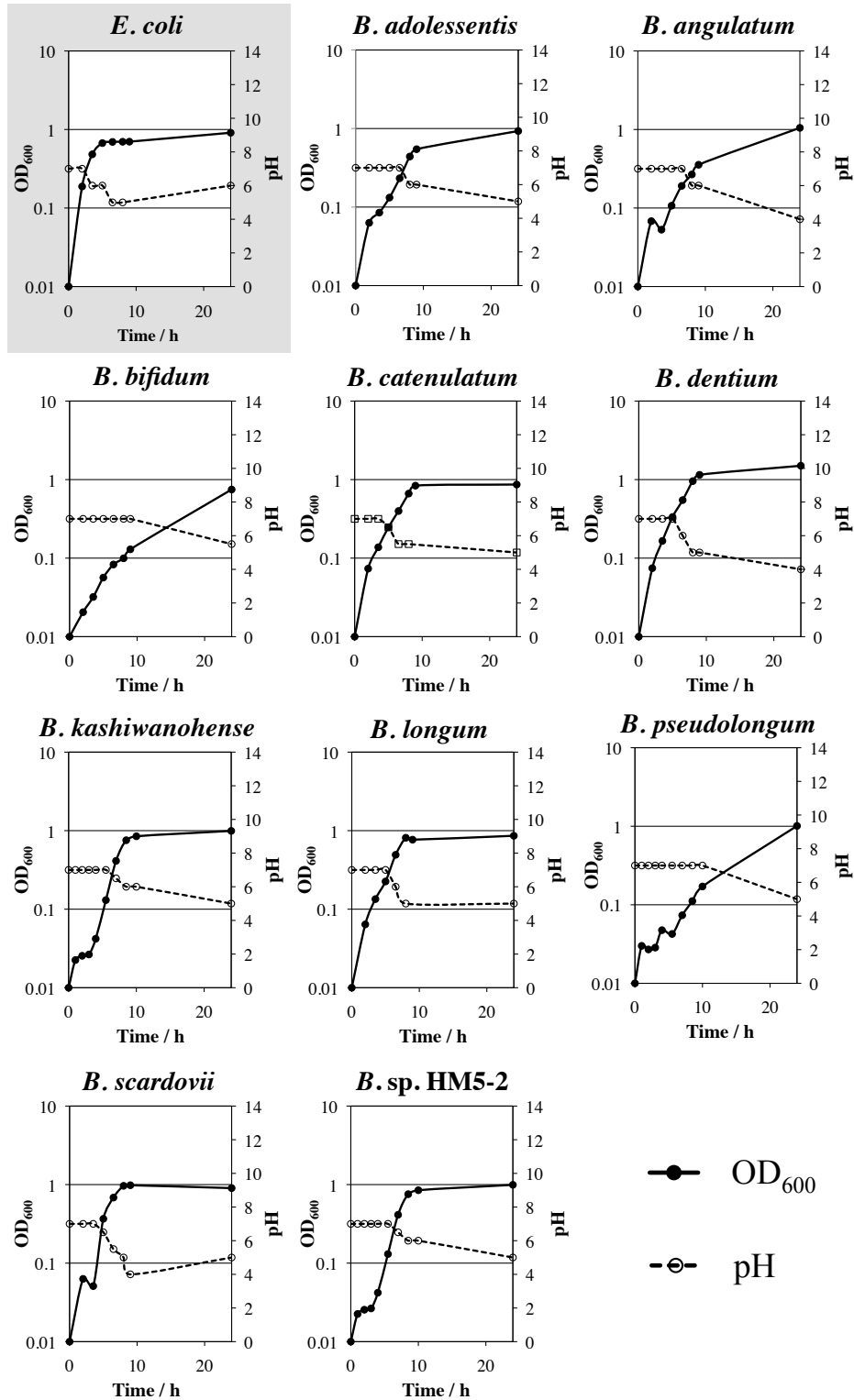


Fig.6. 大腸菌 W3110 及びビフィズス菌の増殖曲線と培養液 pH の変化

各菌の培養液の OD₆₀₀(●)と、pH(○)を経時的に測定した。菌種によって増殖速度には差があったが最終的に達する OD₆₀₀の値は全て 1.0 前後であった。また pH は大腸菌が 5~6 だったのに対し、ビフィズス菌は酸性寄りの 4~5.5 の値をとった。

3-1-2. コロニー形成

大腸菌 W3110 及び *B. longum* を 5 mL の ABCM 培地に植菌し窒素条件条件下で培養した培養液を段階希釈し、BL 寒天培地に塗布して CO₂ 嫌気条件下で培養を行い各細菌にコロニーを形成させた。その結果、一晚培養した後の大腸菌のコロニーと寒天培地の境界面がぼやけており、潰れた形をしていた(Fig. 7a)。一方、ビフィズス菌のコロニーは一晚培養では大腸菌に比べコロニーの大きさは小さく、またコロニーと寒天培地との境界面がくっきりしており、隆起したドーム状の形状をしていた(Fig. 7b)。他のビフィズス菌のコロニーの形態も *B. longum* と同様であることから、コロニーの形体の違いにより大腸菌とビフィズス菌のコロニーを容易に見分けることが可能であることが分かった。

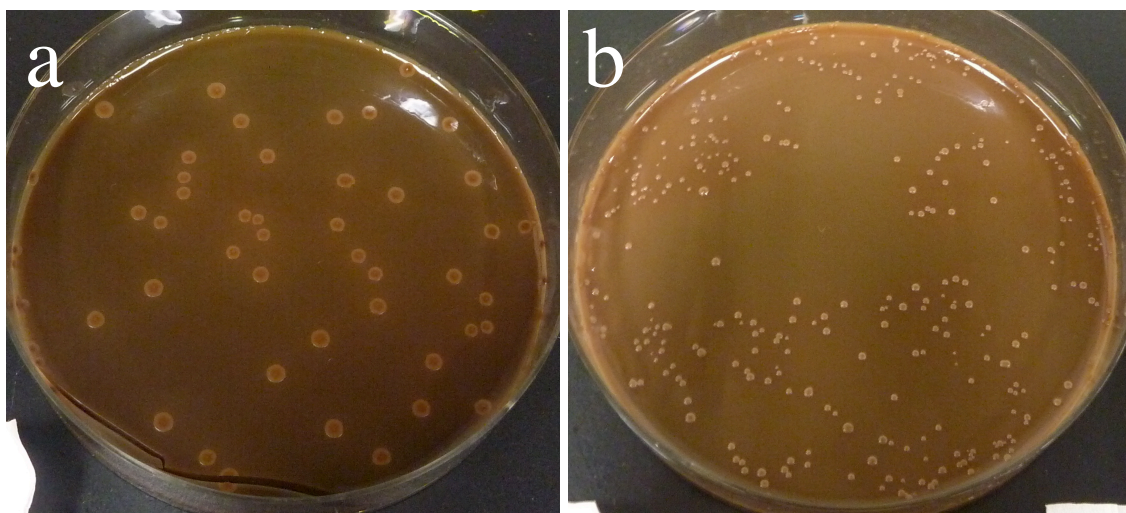


Fig. 7. 大腸菌とビフィズス菌のコロニー形態

(a)大腸菌のコロニー(*E. coli* JW2652) (b)ビフィズス菌コロニー(*B. longum*)

3-2. 大腸菌 W3110 と各ビフィズス菌種との共培養

3-2-1. 共培養時の増殖曲線と培養液 pH

大腸菌とビフィズス菌を ABCM 培地で培養することが確認できたので、次に大腸菌 W3110 を各種ビフィズス菌 *B. adolescentis*、*B. angulatum*、*B. bifidum*、*B. catenulatum*、*B. dentium*、*B. kashiwanohense*、*B. longum*、*B. pseudolongum*、*B. scardovii*、*B. sp.* HM5-2 と共培養を行い、その増殖曲線と培養液の pH の変化を調べた。ABCM 培地 5 mL で前培養した大腸菌 W3110 と各種ビフィズス菌の培養液を新たな ABCM 培地 5 mL に 50 μ L ずつ混合して植菌し 24 時間経時的に濁度と pH を測定した。

その結果、大腸菌 W3110 と *B. adolescentis* の共培養では、植菌直後は各菌の純粋培養よりも対数増殖期に入るのが遅かったが、対数増殖期に入った後は *B. adolescentis* の純粋培養時と同様の培養 10 時間で定常期に達した。そして培養 24 時間で OD₆₀₀ は各菌の純粋培養と同様の 0.950 となった。また共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は *B. adolescentis* の純粋培養より早く、定常期には pH 5 まで低下した。

大腸菌 W3110 と *B. angulatum* の共培養では、植菌直後から対数的に増殖し、*B. adolescentis* の純粋培養時と同様の培養 10 時間で定常期に達した。しかし定常期に達した時の OD₆₀₀ は大腸菌 W3110 の純粋培養時と同様であった。そして培養 24 時間で OD₆₀₀ は各菌の純粋培養よりやや高い 1.312 となった。また共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は *B. adolescentis* の純粋培養時より早く、定常期には pH 4 まで低下した。

大腸菌 W3110 と *B. bifidum* の共培養では、植菌直後 3 時間はほとんど増殖しなかったが、培養 4 時間ぐらいから大腸菌 W3110 の純粋培養時と同様の速度で対数的に増殖した。そして培養 6 時間で定常期に達した。また定常期に達した時の OD₆₀₀ は大腸菌 W3110 の純粋培養時と同様であった。そして培養 24 時間で OD₆₀₀ は各菌の純粋培養とほぼ同様の 1.041 となった。次に共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は大腸菌 W3110 と *B. adolescentis* の純粋培養時の中間の値を終始示し、培養 24 時間では pH 5.5 となった。

大腸菌 W3110 と *B. catenulatum* の共培養では、植菌直後から大腸菌 W3110 及び *B. catenulatum* の純粋培養時と同様の速度で対数的に増殖した。そして培養 8 時間で定常期に達した。その後、培養 24 時間で OD₆₀₀ は各菌の純粋培養とほぼ同様の 0.933 となった。次に共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は大腸菌 W3110 と *B. adolescentis* の純粋培養時とほぼ変わらず、定常期には pH 5.5 となった。

大腸菌 W3110 と *B. dentium* の共培養では、植菌直後から *B. dentium* の純粋培養時と同様の速度で対数的に増殖した。そして *B. dentium* の純粋培養同様、培養 8 時間で定常期に達した。その後、培養 24 時間で OD₆₀₀ は *B. dentium* の純粋培養と同様の 1.730 となった。次に共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は *B. dentium* の純粋培養時とほぼ変わらず、培養 24 時間では pH 4 となった。

大腸菌 W3110 と *B. kashiwanohense* の共培養では、植菌直後から大腸菌 W3110 の純粋培養時と同様の速度で対数的に増殖した。そして大腸菌 W3110 の純粋培養同様、培養 6 時間で定常期に達した。その後、培養 24 時間で OD₆₀₀ は大腸菌

W3110 と *B. dentium* の純粋培養の中間の 0.869 となった。次に共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は大腸菌 W3110 の純粋培養時と変わらず、培養 24 時間では pH 5 となった。

大腸菌 W3110 と *B. longum* の共培養では、植菌直後から大腸菌 W3110 と *B. longum* の純粋培養時の中間の速度で増殖した。そして培養 8 時間で定常期に達した。その後、培養 24 時間で OD₆₀₀ は大腸菌 W3110 と *B. longum* の純粋培養とほぼ同様の 0.896 となった。次に共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は大腸菌 W3110 と *B. longum* の純粋培養時と中間の速度で低下し、定常期には *B. longum* 純粋培養時と同様の pH 5 となった。

大腸菌 W3110 と *B. pseudolongum* の共培養では、植菌直後から大腸菌 W3110 の純粋培養時と同様に速度で増殖した。そして培養 6 時間で定常期に達した。その後、培養 24 時間で OD₆₀₀ は大腸菌 W3110 と *B. pseudolongum* の純粋培養とほぼ同様の 0.893 となった。次に共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は大腸菌 W3110 の純粋培養時と中間の速度で低下し、定常期には大腸菌 W3110 と *B. pseudolongum* の純粋培養時と同様の pH 5 となった。

大腸菌 W3110 と *B. scardovii* の共培養では、*B. scardovii* の純粋培養時と同様に培養時間で一旦停滞してその後対数的に増殖した。そして培養 8 時間で定常期に達した。その後、培養 24 時間で OD₆₀₀ は大腸菌 W3110 と *B. scardovii* の純粋培養と同様の 0.919 となった。次に共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は *B. scardovii* の純粋培養時と中間の速度で低下し、定常期初期に一旦 pH 4 に下がった後、培養 24 時間後には *B. scardovii* の純粋培養時と同様の pH 5 となった。

大腸菌 W3110 と *B. sp. HM5-2* の共培養では、大腸菌 W3110 と *B. sp. HM5-2* の純粋培養時の中間の速度で増殖した。そして培養 6 時間で定常期に達した。その後、培養 24 時間で OD₆₀₀ は *B. sp. HM5-2* の純粋培養とほぼ同様の 1.010 となった。次に共培養液 pH は植菌時 pH 7 であったのが各菌の純粋培養時と同様に細菌の増殖に伴い低下した。低下速度は *B. sp. HM5-2* の純粋培養時と同様の速度で低下し、定常期には *B. longum* 純粋培養時と同様の pH 5 となった。

以上の結果より、大腸菌 W3110 と各種ビフィズス菌を混合した場合でも培養液濁度が増加したことから、両菌を同じ培地に植菌しても細菌が培養できることが確認できた。それぞれの細菌の純粋培養と共培養を比較したグラフを Fig. 8 にまとめた。

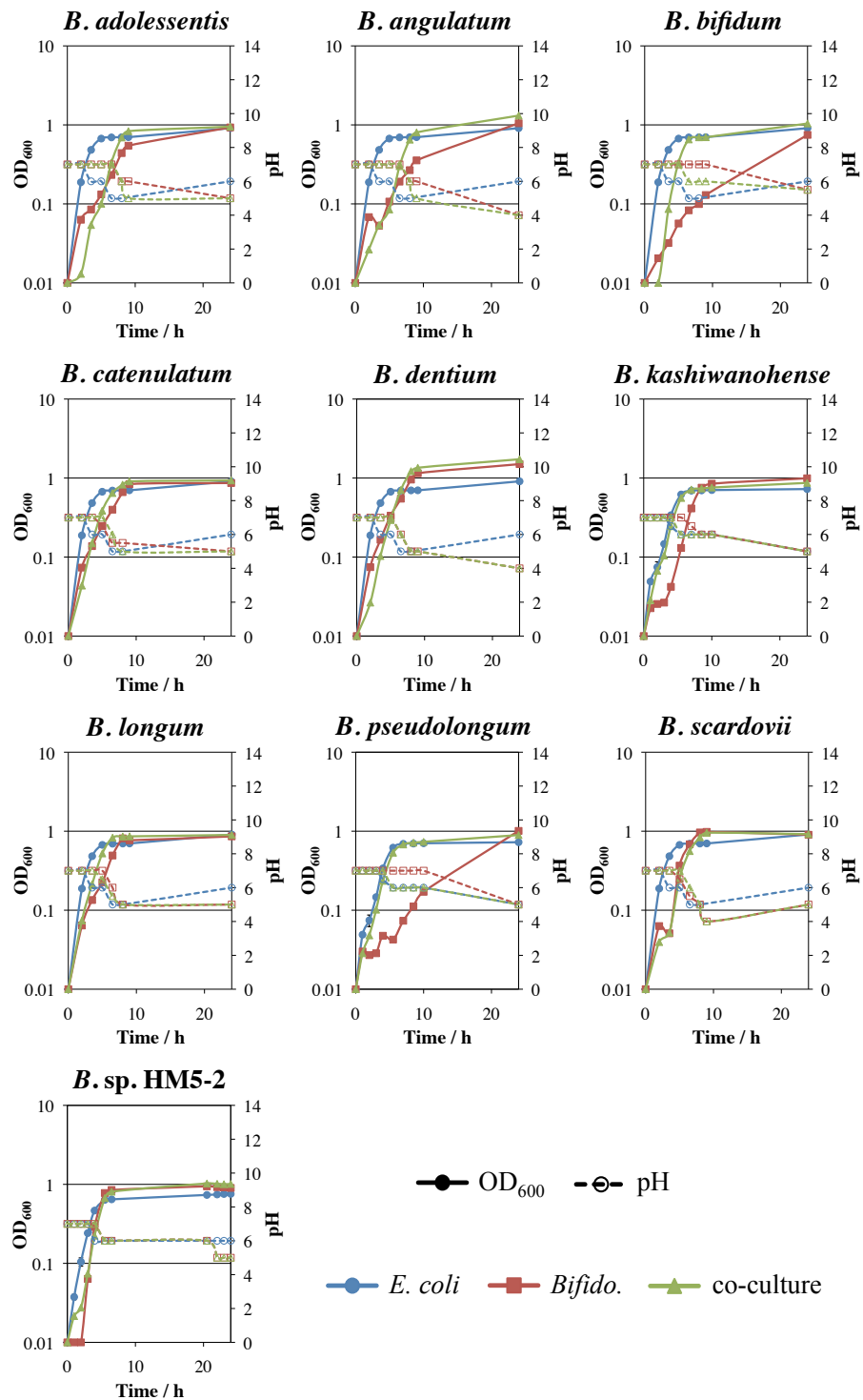


Fig. 8. 大腸菌と各種ビフィズス菌の共培養時の増殖曲線と培養液 pH

大腸菌と各ビフィズス菌の共培養液の OD₆₀₀(実線)と、pH(破線)を経時的に測定した。どの菌種との共培養でも最終的に達する OD₆₀₀の値は 1.0 前後であり、その増殖曲線の軌跡は各菌の単独培養の軌跡の中間を通るような形となった。また pH は大腸菌が 5~6 であるのに対し、ビフィズス菌は菌種によって差異があるが、酸性寄りの 4~5.5 の値をとった。

3-2-2. 定常期共培養液中の生菌数

増殖曲線の測定により、大腸菌とビフィズス菌の共培養において細菌が増殖していることは確認できたが、大腸菌とビフィズス菌がそれぞれどのように増殖しているかは OD₆₀₀ の値から判断できない為、他の方法で培養液中の生菌を確認する必要があった。そこで大腸菌と各種ビフィズス菌 *B. adolescentis*、*B. angulatum*、*B. bifidum*、*B. catenulatum*、*B. dentium*、*B. longum*、*B. pseudolongum*、*B. scardovii*、*B. sp. HM5-2* の共培養液中における各菌の生菌数を調べた。まず大腸菌 W3110 と各種ビフィズス菌の前培養を行い、その後大腸菌 W3110 各種ビフィズス菌の共培養を行った。共培養では ABCM 培地 5 mL に対してビフィズス菌前培養液を 50 µL 植菌したのに対し、大腸菌は 50 µL, 5 µL, 10 倍希釈したもの 5 µL と植菌量を変化させて植菌して 37°C 窒素嫌気条件下にて 24 時間共培養を行った。その後、共培養の植菌に用いた前培養液と共培養後の共培養液中の生菌数を CFU/mL で算出した。

その結果、大腸菌 W3110 と *B. angulatum* の共培養では、大腸菌 W3110 と *B. angulatum* の植菌数に最大 10 倍前後の差があったが、共培養定常期に形成される細菌叢における両菌間の生菌数には 10 倍以上の差はなかった。また植菌数の差に関係なく最終的な培養液中の総細菌数にも大きな差はなかった。

大腸菌 W3110 と *B. catenulatum* の共培養では、大腸菌 W3110 と *B. catenulatum* の植菌数に最大 10000 倍近くの差があったが、共培養定常期に形成される細菌叢における両菌間の生菌数には 10 倍以上の差はなかった。また植菌数の差に関係なく最終的な培養液中の総細菌数にも大きな差はなかった。

大腸菌 W3110 と *B. longum* の共培養では、大腸菌 W3110 と *B. longum* の植菌数に最大 100 倍近くの差があったが、共培養定常期に形成される細菌叢における両菌間の生菌数には 10 倍以上の差はなかった。また植菌数の差に関係なく最終的な培養液中の総細菌数にも大きな差はなかった。

大腸菌 W3110 と *B. pseudolongum* の共培養では、大腸菌 W3110 と *B. pseudolongum* の植菌数に最大 500 倍近くの差があったが、共培養定常期に形成される細菌叢における両菌間の生菌数には 10 倍以上の差はなかった。また植菌数の差に関係なく最終的な培養液中の総細菌数にも大きな差はなかった。

大腸菌 W3110 と *B. scardovii* の共培養では、大腸菌 W3110 と *B. scardovii* の植菌数に最大 10 倍近くの差があったが、共培養定常期に形成される細菌叢における両菌間の生菌数には 10 倍以上の差はなかった。また植菌数の差に関係なく最終的な培養液中の総細菌数にも大きな差はなかった。

大腸菌 W3110 と *B. sp. HM5-2* の共培養では、大腸菌 W3110 と *B. longum* の植菌数に最大 50 倍近くの差があったが、共培養定常期に形成される細菌叢における両菌間の生菌数には 10 倍以上の差はなかった。また植菌数の差に関係なく最

終的な培養液中の総細菌数にも大きな差はなかった。

また、大腸菌 W3110 と *B. adolescentis*、*B. bifidum*、*B. dentium* の共培養では、BL 寒天培地に各ビフィズス菌のコロニーが形成されず *B. adolescentis* の CFU/mL が算出できなかったため、生菌数が求められなかった。

以上の結果から、コロニーが確認できた共培養については 大腸菌とビフィズス菌の植菌細胞数に最大 10000 倍近い差があるにもかかわらず定常期まで共培養を行うとほぼ全てのビフィズス菌種との共培養において各菌の生菌数の差は 10 倍未満になった(Fig. 9)。

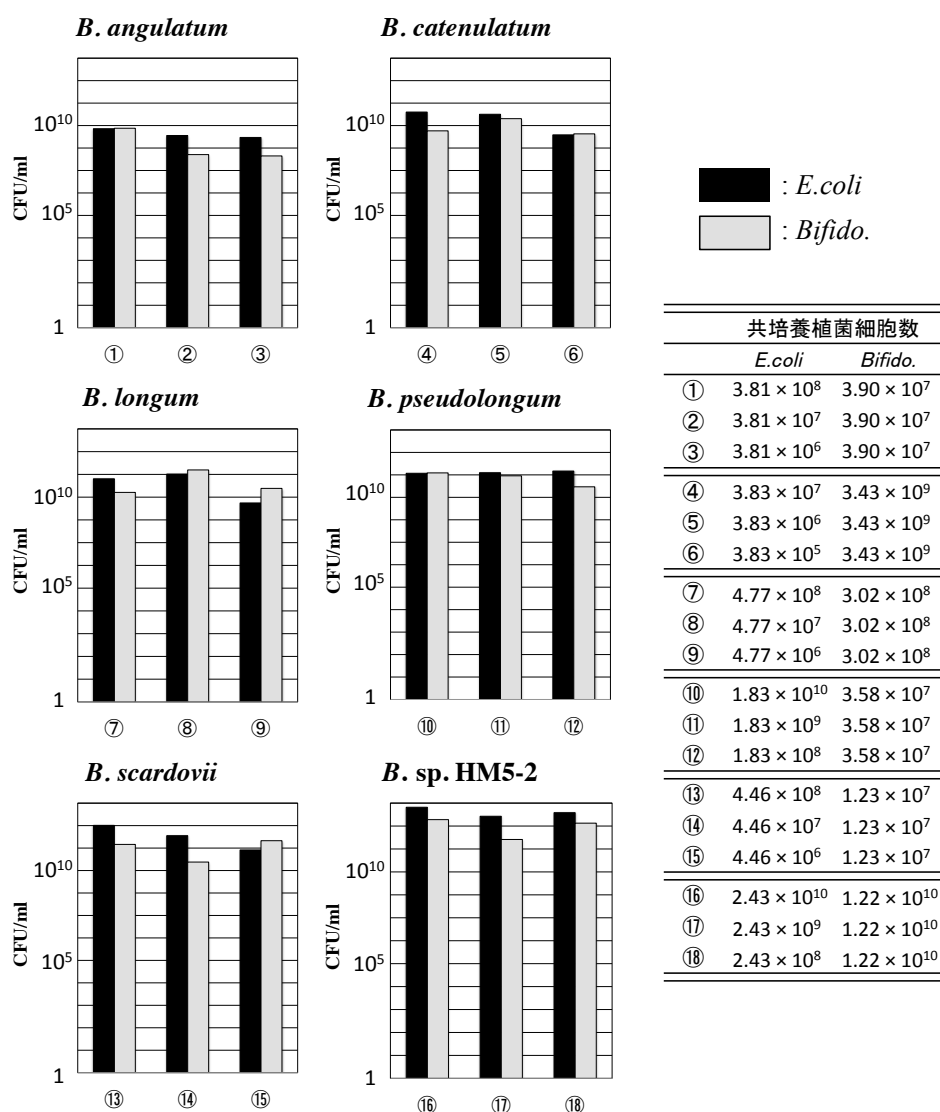


Fig. 9. 大腸菌 W3110 と各ビフィズス菌の共培養での植菌細胞数の定常期細菌叢への影響
共培養に植菌した各菌の細胞数の違いによらず共培養定常期の量菌の生菌数には 10 倍以上の開きはなく一定の細菌叢に落ち着いた。

3-2-3. 共培養実験の総括

以上の *E. coli* W3110 と各種ビフィズス菌の共培養の実験結果を Table 4 にまとめた。ABCM 培地にて 10 種類のビフィズス菌(*B. adolescentis*、*B. angulatum*、*B. bifidum*、*B. catenulatum*、*B. dentium*、*B. kashiwanohense*、*B. longum*、*B. pseudolongum*、*B. scardovii*、*B. sp. HM5-2*)の培養に成功し、そのうち 6 種類のビフィズス菌(*B. angulatum*、*B. catenulatum*、*B. longum*、*B. pseudolongum*、*B. scardovii*、*B. sp. HM5-2*)について *E. coli* W3110 との共培養に成功した。この 6 種類のビフィズス菌株との共培養において、植菌した大腸菌とビフィズス菌の細胞数に関係なく定常期に形成される細菌叢に大きな差は見られなかった。このことから大腸菌とビフィズス菌間で何らかの細胞間コミュニケーションが存在しており、それによって特定の細菌叢を形成することが示唆された。

Table 4. 大腸菌と各ビフィズス菌種との共培養の結果

菌株	液体培地培養	寒天培地培養	共培養定常期の平均生菌数(CFU/mL)	
			大腸菌	ビフィズス菌
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	○	×	—	—
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	○	○	4.60×10^8	2.85×10^8
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	○	×	—	—
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	○	○	2.52×10^8	1.01×10^9
<i>Bifidobacterium dentium</i>	○	×	—	—
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	○	—	—	—
<i>Bifidobacterium longum</i>	○	○	5.76×10^9	6.58×10^9
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	○	○	1.30×10^{10}	8.09×10^9
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	○	○	4.88×10^{10}	1.27×10^{10}
<i>Bifidobacterium sp. HM5-2</i>	○	○	4.36×10^{11}	1.17×10^{11}

3-3. *B. longum* との共培養で発現する大腸菌プロモーター

3-3-1. *B. longum* との共培養定常期に発現する大腸菌プロモーター

ビフィズス菌との共培養時に発現が上昇する大腸菌プロモーターを探索する為、PPT クローンを用いた。PPT クローンは 904 種類の大腸菌プロモーターが GFP をレポーター遺伝子として持つ pGRP ベクターにクローン化されたセットである。この PPT クローンの大腸菌 DH5 α 形質転換体と代表的なビフィズス菌である *B. longum* の共培養を行うことで、もし pGRP ベクターにクローニングされている大腸菌遺伝子プロモーターが誘導されれば GFP が生合成され大腸菌体が緑色に蛍光する(Fig. 10)。この GFP の蛍光する原理であるが、GFP の蛍光団は GFP のアミノ酸配列の 65 番目のセリン、66 番目のチロシン、67 番目のグリシンによって形成されており、この 3 アミノ酸が GFP のフォールディングの際に環化付加、酸化および脱水を経ることによって共役二重結合による π 電子の共

有が起きる(Fig. 11)(Miyawaki et al., 2003)。ここに紫外光などのエネルギーの高い光が当たると、この電子が励起される。このエネルギー準位の上がった電子がもとの低いエネルギー準位に戻るときに緑色である波長 530 nm の光を放出する。またこの蛍光団は蛋白質の β バレル内に存在するため非常に安定である。(Fig. 12)(Ormö et al., 1996)

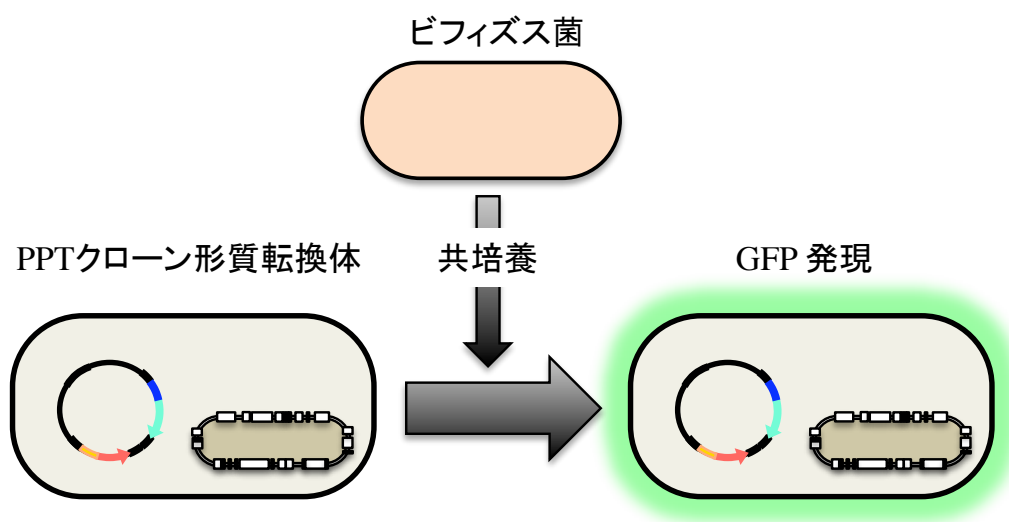


Fig. 10. PPT クローンをういた大腸菌遺伝子プロモーター活性化モデル

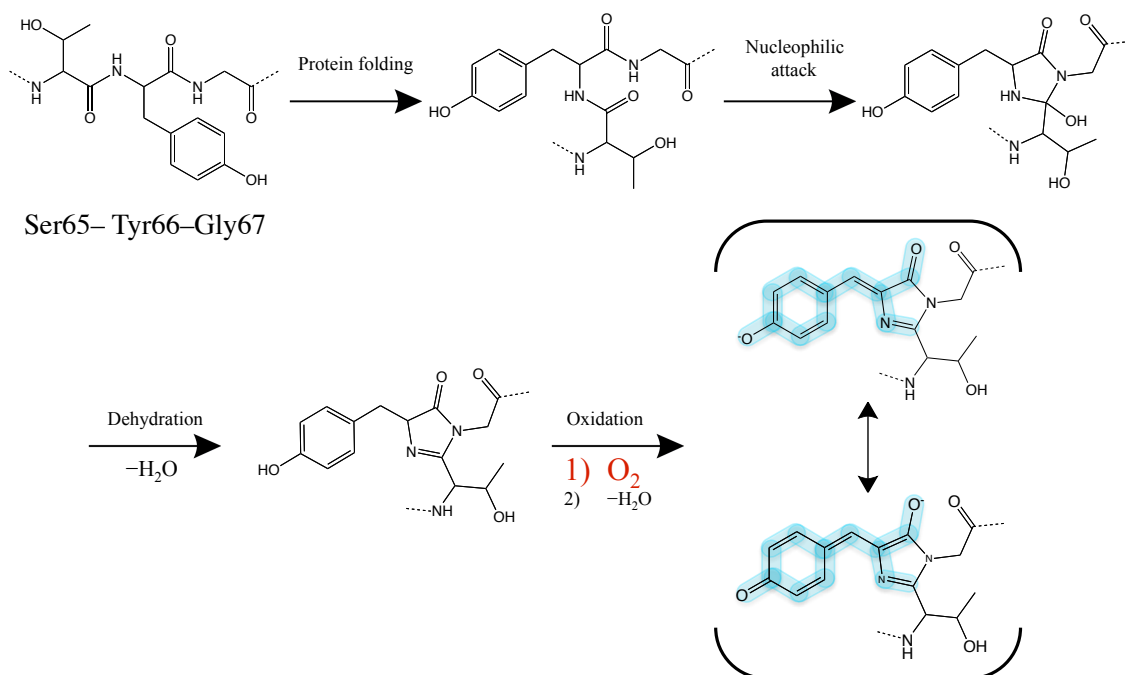


Fig. 11. GFP 蛍光団の形成と π 電子共役

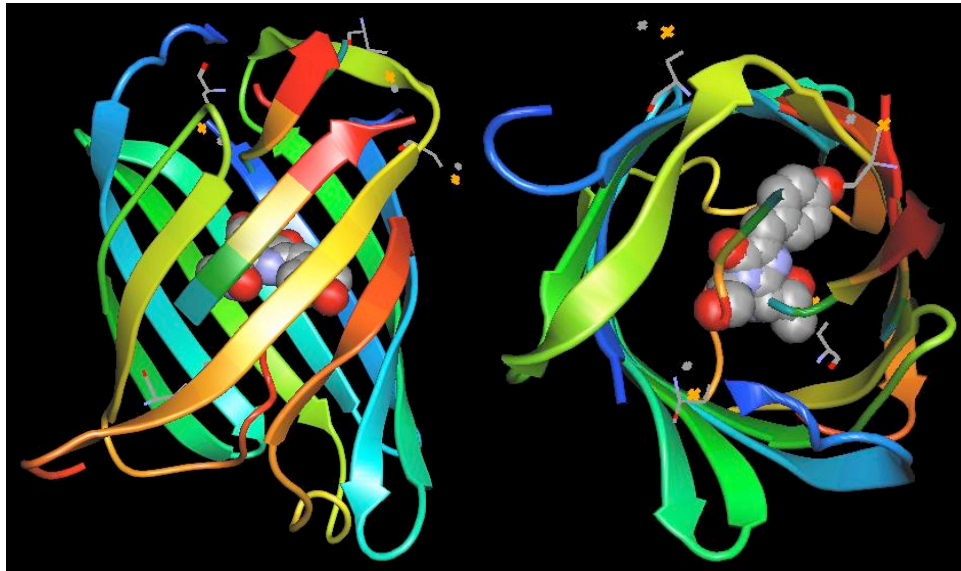


Fig. 12. GFP 内の蛍光団の位置

ボールで表示している原子団が GFP の蛍光団を示している。蛍光団は β -バレルの内部に全体が収まっており、非常に安定している。

この PPT クローンを用いたスクリーニングの実験として、まず PPT クローンが形質転換された大腸菌 DH5 α を 96 穴平板プレート内の 200 μ l の ABCM 培地にて好気条件下の 37 $^{\circ}$ C で一晩前培養を行った。またビフィズス菌を 5 ml の ABCM 培地にて窒素嫌気条件下の 37 $^{\circ}$ C で一晩前培養を行った。次に、96 穴 deep プレート 2 枚に 1.5 ml の ABCM 培地を分注し、一方のプレートには大腸菌のみを、もう一方のプレートには大腸菌と *B. longum* の両方を植菌した。植菌量は ABCM 培地で 100 倍に希釈した大腸菌前培養液を 15 μ L、希釈していないビフィズス菌前培養液を 18.6 μ L 植菌し 24 時間培養した(Fig. 13)。培養後、蛍光プレートリーダー FL600 を用いて GFP の蛍光強度を測定した。測定後、得られた各サンプルの蛍光強度の値からバックグラウンドである ABCM 培地の蛍光強度の値を引いた後、大腸菌単独培養時と大腸菌-ビフィズス菌共培養時の蛍光強度を比較することで *B. longum* との共培養で特異的に発現する大腸菌プロモーターを探索した。

その結果、37 プロモーターの共培養液の緑色蛍光強度が単独培養よりも 2 倍以上上昇した(Fig. 14)。発現が上昇した 37 プロモーターとその機能を Table 5 に示した。この 37 プロモーターにはさまざまな種類の遺伝子のプロモーターであり、*B. longum* が存在すると、純粋培養に比べ大きく遺伝子発現が変わることが示唆された。また細菌の膜に存在するトランスポーターやアンチポーター遺伝子のプロモーターもいくつか誘導されていることから細胞内外の物質の出入りがより行われていることが示唆された。

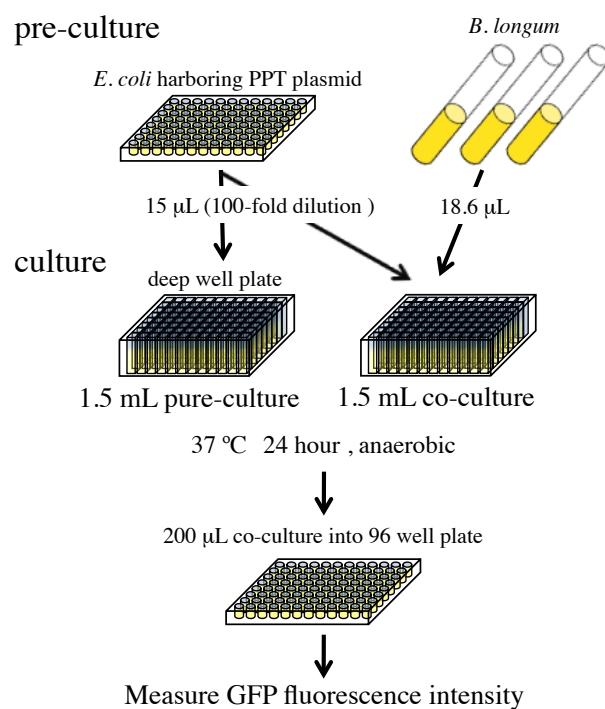


Fig. 13. 蛍光プレートリーダーを用いたスクリーニングの概略図

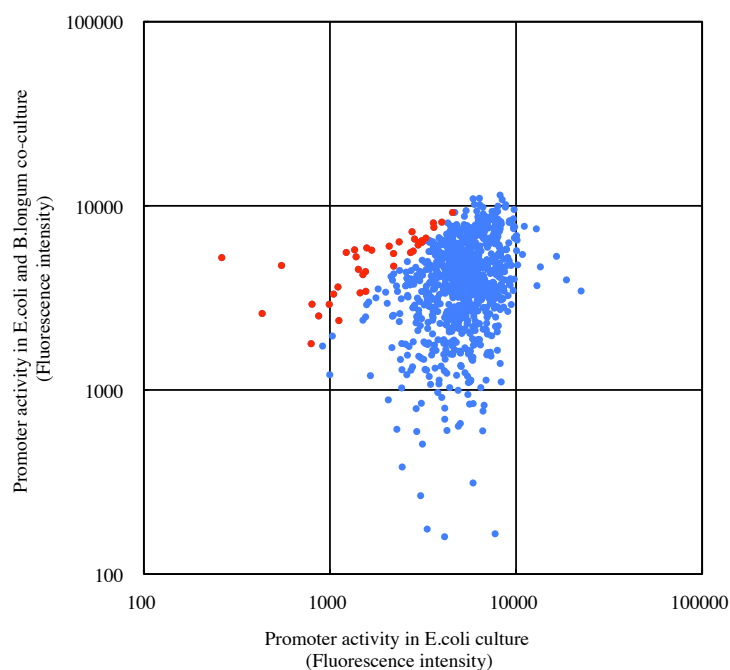


Fig. 14. *B. longum* 有無における PPT クローン形質転換体の蛍光強度散布図

横軸が PPT クローンを保持する大腸菌単独培養時の蛍光強度、縦軸が PPT クローンを保持する大腸菌と *B. longum* の共培養時の蛍光強度を示す。単独培養時に比べ共培養時に蛍光強度が 2 倍以上上昇したプロットを赤色で示した。

Table 5. *B. longum* との共培養定常期に発現する大腸菌プロモーター

Gene	Product	*Ratio +/-
Membrane protein		
<i>bamA</i>	conserved hypothetical protein , membrane	2.03
<i>chaA</i>	calcium/sodium:proton antiporter	3.75
<i>cusF</i>	periplasmic copper-binding protein	2.09
<i>eutH</i>	predicted inner membrane protein	19.96
<i>macA</i>	macrolide transporter subunit, membrane fusion protein (MFP) component	3.65
<i>macB</i>	fused macrolide transporter subunits of ABCsuperfamily: ATP-binding component/membrane component	2.25
<i>mdtM</i>	multidrug efflux system protein	2.04
<i>mgtA</i>	magnesium transporter	2.62
<i>proW</i>	glycine betaine transporter subunit	2.14
<i>proX</i>	glycine betaine transporter subunit	8.63
<i>pstB</i>	phosphate transporter subunit	6.02
<i>qseC</i>	sensory histidine kinase in two-component regulatory system with QseB	2.51
<i>srlA</i>	glucitol/sorbitol-specific enzyme IIC component of PTS	2.90
Enzyme		
<i>cdsA</i>	CDP-diglyceride synthase	3.82
<i>dcm</i>	DNA cytosine methylase	2.02
<i>fixC</i>	predicted oxidoreductase with FAD/NAD(P)-binding domain	4.25
<i>glxK</i>	glycerate kinase II	2.94
<i>lysC</i>	aspartokinase III	3.17
<i>mraY</i>	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase	3.43
<i>serB</i>	3-phosphoserine phosphatase	3.28
Regulator		
<i>cheY</i>	chemotaxis regulator transmitting signal to flagellar motor component	2.20
<i>envR</i>	DNA-binding transcriptional regulator	2.83
<i>malI</i>	DNA-binding transcriptional repressor	2.13
<i>mlrA</i>	DNA-binding transcriptional regulator	2.71
<i>rpiR</i>	DNA-binding transcriptional repressor	2.32
<i>tus</i>	inhibitor of replication at Ter, DNA-binding protein	2.06
Other		
<i>hspG</i>	molecular chaperone HSP90 family	2.11
<i>rpsB</i>	30S ribosomal subunit protein S2	2.04
<i>rpsF</i>	30S ribosomal subunit protein S6	2.32
Unknown		
<i>yabQ</i>	hypothetical protein	2.03
<i>ycgZ</i>	hypothetical protein	2.90
<i>ydeH</i>	conserved hypothetical protein	2.25
<i>ygaR</i>	hypothetical protein	2.07
<i>ygaU</i>	hypothetical protein	3.18
<i>yiaG</i>	predicted transcriptional regulator	2.06
<i>yjbJ</i>	predicted stress response protein	4.56
<i>yjiQ</i>	predicted DNA-binding transcriptional regulator	2.81

*Ratio +/- : GFP intensity ratio of co-culture to pure culture

Table 6. *B. longum* CM で誘導される大腸菌プロモーター

Gene	GFP intensity		*1Ratio
	ABCM	CM	
<i>bamA</i>	2.0	5.5	2.71
<i>cdsA</i>	2.0	2.9	1.45
<i>chaA</i>	17.7	26.6	1.50
<i>cheY</i>	6.6	10.2	1.55
<i>cusF</i>	2.8	1.7	0.61
<i>dcm</i>	1.1	2.5	2.27
<i>envR</i>	1.6	1.7	1.10
<i>eutH</i>	3.1	3.9	1.27
<i>fixC</i>	12.8	20.0	1.56
<i>glxK</i>	0.9	1.9	2.02
<i>htpG</i>	18.7	27.3	1.46
<i>lysC</i>	1.3	2.9	2.21
<i>macA</i>	1.1	1.4	1.19
<i>macB</i>	1.4	1.7	1.24
<i>malI</i>	7.8	8.9	1.14
<i>mdtM</i>	2.0	2.8	1.43
<i>mgtA</i>	1.5	2.2	1.51
<i>mlrA</i>	1.2	2.8	2.27
<i>mraY</i>	2.3	2.8	1.23
<i>proW</i>	1.5	2.2	1.48
<i>proX</i>	2.5	3.1	1.27
<i>pstB</i>	6.2	9.3	1.51
<i>qseC</i>	2.0	2.4	1.22
<i>rpiR</i>	3.0	3.4	1.16
<i>rpsB</i>	75.9	154.1	2.03
<i>rpsF</i>	61.0	102.1	1.67
<i>serB</i>	2.9	1.4	0.49
<i>srlA</i>	31.7	40.3	1.27
<i>tus</i>	2.7	2.8	1.07
<i>yabQ</i>	1.8	2.2	1.20
<i>ycgZ</i>	69.8	92.1	1.32
<i>ydeH</i>	1.0	5.4	5.55
<i>ygaR</i>	1.5	3.5	2.41
<i>ygaU</i>	31.7	43.9	1.39
<i>yiaG</i>	1.5	6.7	4.38
<i>yjbJ</i>	21.6	96.0	4.44
<i>yjiQ</i>	1.3	3.3	2.60

*1Ratio : GFP intensity ratio of CM culture to ABCM culture

3-3-2. ビフィズス菌培養上清で発現する大腸菌プロモーター

3-3-2-1. *B. longum* の培養上清で発現する大腸菌プロモーター

ビフィズス菌 *B. longum* との共培養で発現が上昇した 37 プロモーターに対して、QS と同様に *B. longum* が培養液中に放出する何らかの物質によって誘導されているかどうか調べる為、*B. longum* の培養上清を用いた CM による大腸菌プ

ロモーターの活性測定を行った。PPT クローンが形質転換された大腸菌 DH5 α を Amp を添加した ABCM 培地にて好気条件下の 37°C で一晩前培養を行った。前培養後、調製した Amp を添加した CM 1.5 mL に前培養液を 15 μ L 植菌し窒素嫌気条件下の 37°C で 24 時間培養した。培養後、細菌細胞を洗菌して培養液を ddH₂O へ溶媒置換を行った。培養後の細菌培養液 1 mL を 1.5 mL のチューブに移し、遠心機で 10000 rpm、10 分、4°C で遠心分離し細胞を沈殿させ上清をアスピレーターにて除去した。次に沈殿している細胞に 1 mL の ddH₂O を加え懸濁し、菌を洗浄した。その後、再度 10000 rpm、10 分、4°C で遠心分離して細胞を沈殿させ上清をアスピレーターにて除去した。その後、ddH₂O を 200 μ L 加え沈殿している細胞を懸濁し、5 倍濃縮の細菌溶液を得た。その後、蛍光プレートリーダー-MTP-880 を用いて GFP の蛍光強度を測定した。測定後、各サンプルの蛍光強度からバックグラウンドとして溶媒置換に用いた ddH₂O の蛍光強度を引き、次に各サンプルの蛍光強度を OD₆₀₀ の値で割ることでノーマライズした。ノーマライズされた各サンプルの蛍光強度を、ABCM 培地で培養した際の蛍光強度で割ることで蛍光強度比を求めた。ただし、ノーマライズした時点で蛍光強度の値が一桁であるサンプルについては蛍光強度が弱すぎる為、蛍光強度比の値によらず発現していないものとみなした。

その結果、ABCM 培地で通常培養した場合よりも蛍光強度が 3 倍以上上昇した *yjbJ* プロモーターが得られた(Table 6)。この結果から *yjbJ* プロモーターは *B. longum* が菌外に放出する分泌物によって誘導されていることが示唆され、大腸菌とビフィズス菌間の QS によって誘導されていることが考えられた。

3-3-2-2. 他種ビフィズス菌培養上清で発現する大腸菌プロモーター

次にこの *yjbJ* プロモーターについて大腸菌 CM や他のビフィズス菌種 CM で誘導されるかどうか調べた。まず 3-3-2-1 と同様に *E. coli* W3110, *E. coli* DH5 α , *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenura*, *B. kashiwanohense*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. scardovii* の CM を作製した。次に *yjbJ* プロモーターがクローニングされた pGRN104 の DH5 α 形質転換体を 5 mL の Amp を添加した ABCM 培地、好気条件下の 37°C で一晩前培養した。この前培養液を 5 mL の Amp を添加した CM に 50 μ L 植菌して窒素嫌気条件下の 37°C で 24 時間培養した。培養後、細菌細胞を洗菌して培養液を ddH₂O へ溶媒置換を行った。培養後の細菌培養液 1 mL を 1.5 mL のチューブに移し、遠心機で 10000 rpm、10 分、4°C で遠心分離し細胞を沈殿させ上清をアスピレーターにて除去した。次に沈殿している細胞に 1 mL の ddH₂O を加え懸濁し、菌を洗浄した。その後、再度 10000 rpm、10 分、4°C で遠心分離して細胞を沈殿させ上清をアスピレーターにて除去した。その後、ddH₂O を 200 μ L 加え沈殿している細

胞を懸濁し、5 倍濃縮の細菌溶液を得た。その後、培養後蛍光プレートリーダー MTP-880 を用いて GFP の蛍光強度を測定した。測定後、各サンプルの蛍光強度からバックグラウンドとして溶媒置換に用いた ddH₂O の蛍光強度を引き、次に各サンプルの蛍光強度を OD₆₀₀ の値で割ることでノーマライズした。ノーマライズされた各サンプルの蛍光強度を、ABCM 培地で培養した際の蛍光強度で割ることで蛍光強度比を求めた。

その結果、*yjbJ* プロモーターは *E. coli* W3110, *E. coli* DH5 α , *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenura*, *B. kashiwanohense*, *B. scardovii* CM で ABCM 培地で培養した場合よりも緑色蛍光強度が 2 倍以上上昇した(Fig. 15)。特に、*E. coli* DH5 α と *B. kashiwanohense* の CM では 5 倍以上の蛍光強度の増加が見られ、*yjbJ* プロモーターが大腸菌とビフィズス菌が培養液中に放出する共通の分泌物で誘導されていることが示唆された。一方、*B. pseudocatenulatum* と *B. pseudolongum* の CM では誘導されなかった。このことから、ビフィズス菌種によっては *yjbJ* プロモーターを誘導する因子を分泌していないことが考えられた。

3-3-2-3. 熱処理した細菌培養上清で発現する大腸菌プロモーター

複数のビフィズス菌の CM で誘導された *yjbJ* プロモーターであるが、*yjbJ* プロモーターが QS 同様培養液中の低分子化合物で誘導されているのか、蛋白質などの高分子化合物で誘導されているのかどうか検証した。その為に、*E. coli* W3110, *E. coli* DH5 α , *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenura*, *B. kashiwanohense*, *B. scardovii* の CM を 100°C で 10 分間処理した ACed CM を作製した。次に *yjbJ* プロモーターがクローニングされた pGRN104 の DH5 α 形質転換体を 5 mL の Amp を添加した ABCM 培地、好気条件下の 37°C で一晩前培養した。この前培養液を 5 mL の Amp を含む 100°C で 10 分間処理した ACed CM に 50 μ L 植菌して窒素嫌気条件下の 37°C で 24 時間培養した。培養後、細菌細胞を洗菌して培養液を ddH₂O へ溶媒置換を行った。培養後の細菌培養液 1 mL を 1.5 mL のチューブに移し、遠心機で 10000 rpm、10 分、4°C で遠心分離し細胞を沈殿させ上清をアスピレーターにて除去した。次に沈殿している細胞に 1 mL の ddH₂O を加え懸濁し、菌を洗浄した。その後、再度 10000 rpm、10 分、4°C で遠心分離して細胞を沈殿させ上清をアスピレーターにて除去した。その後、ddH₂O を 200 μ L 加え沈殿している細胞を懸濁し、5 倍濃縮の細菌溶液を得た。その後、培養後蛍光プレートリーダー MTP-880 を用いて GFP の蛍光強度を測定した。測定後、各サンプルの蛍光強度からバックグラウンドとして溶媒置換に用いた ddH₂O の蛍光強度を引き、次に各サンプルの蛍光強度を OD₆₀₀ の値で割ることでノーマライズした。ノーマライズされた各サンプルの蛍光強度

度を、ABCM 培地で培養した際の蛍光強度で割ることで蛍光強度比を求めた。

その結果、*E. coli* W3110, *E. coli* DH5 α , *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. kashiwanohense*, *B. scardovii* の CM で GFP の蛍光強度が ABCM 培地での培養に比べ 2 倍以上上昇した(Fig. 16)。この結果から、これら的大腸菌とビフィズス菌での *yjbJ* の誘導には CM 中の低分子化合物が関与していることが示唆された。しかし、*B. longum*, *B. angulatum*, *B. breve*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum* の CM では誘導されなかった。ただし *B. pseudocatenulatum* と *B. pseudolongum* については 3-3-2-2 で行った熱処理していない CM でも誘導されなかった結果と合致していることから妥当だといえる。しかし、*B. longum*, *B. angulatum*, *B. breve* は熱処理していない CM で誘導されることから、これら的大腸菌 CM での *yjbJ* の誘導には CM 中の熱処理で活性を失う蛋白質などの高分子が関与していることが示唆された。

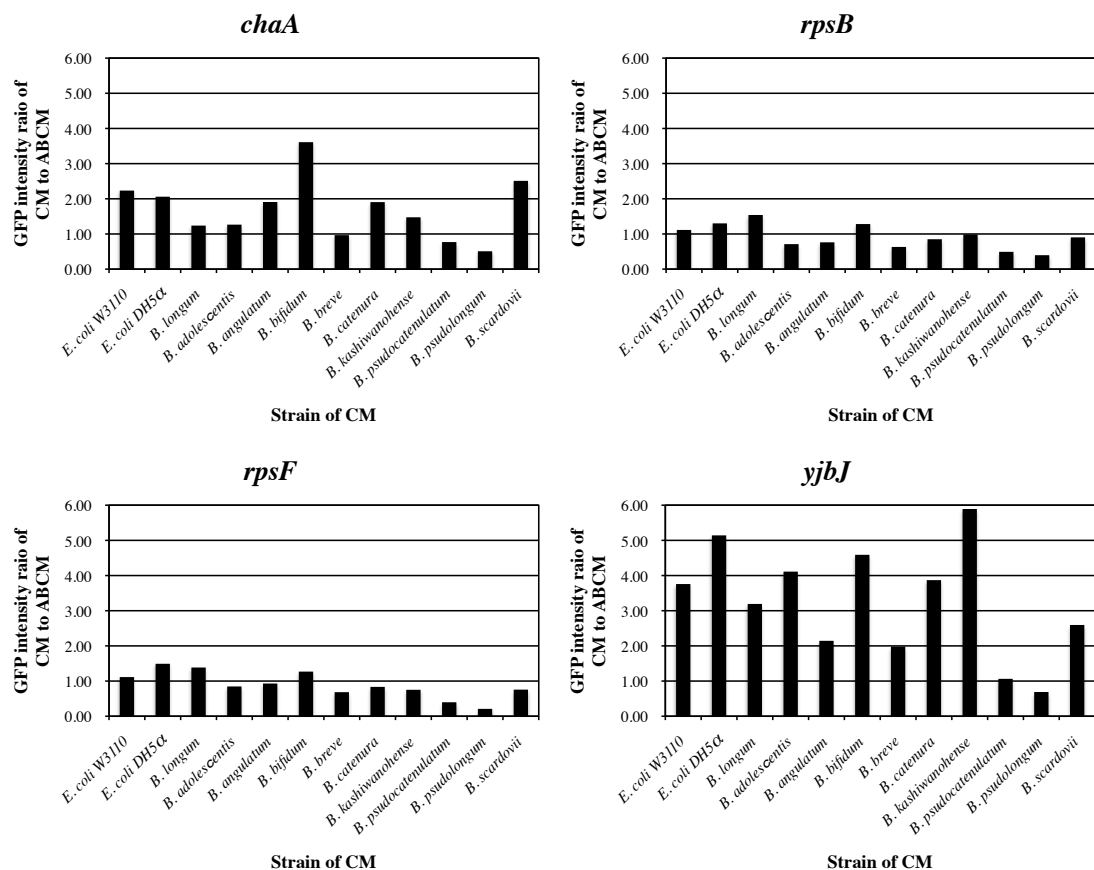


Fig. 15. ビフィズス菌 CM で発現が上昇する大腸菌 *yjbJ* プロモーター

chaA プロモーターは大腸菌 CM を含む一部の CM で誘導された。*rpsB*, *rpsF* プロモーターは *B. longum* の CM で誘導されただけで、他の全ての CM で誘導されなかった。*yjbJ* プロモーターは多くの CM で誘導されたが、*B. pseudocatenulatum* と *B. pseudolongum* の CM では誘導されなかった。

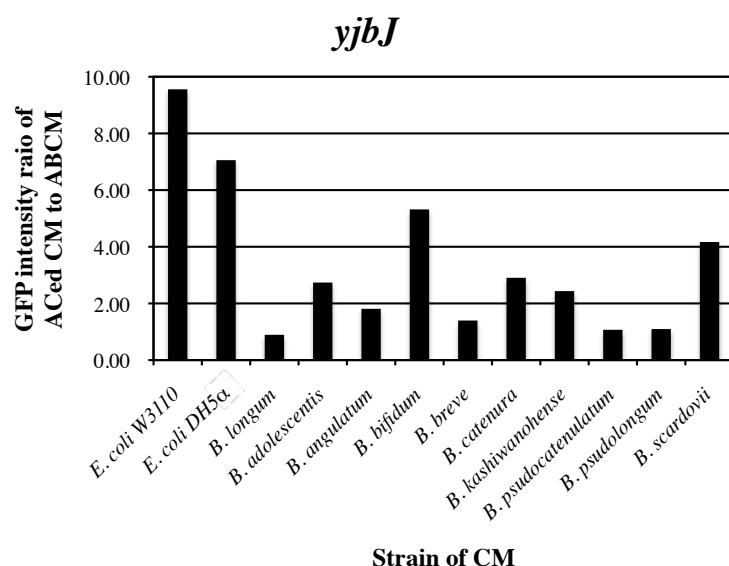


Fig. 16. 熱処理した CM で誘導される *yjbJ* プロモーター

加熱処理した大腸菌を含む複数の CM で *yjbJ* プロモーターが誘導された。熱処理後の大腸菌の CM で強く誘導されたのに対し、逆に *B. longum* の CM では誘導されなくなった。

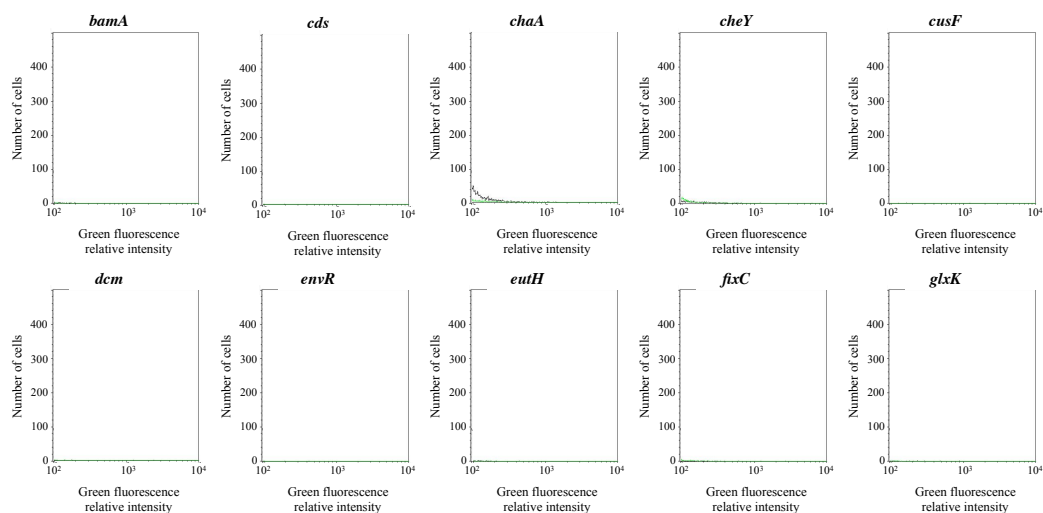
3-3-3. *B. longum* との共培養後早期に発現する大腸菌プロモーター

3-3-3-1. *B. longum* との共培養後早期に発現する大腸菌プロモーター

3-3-2-1 で示されたようにビフィズス菌 *B. longum* との共培養定常期に 37 の大腸菌プロモーターの発現が上昇することが明らかとなったが、これらプロモーターが *B. longum* との共培養によってストレス応答的に直接誘導されているのか、それとも他の遺伝子がまず先に誘導され、その発現した遺伝子によって間接的に誘導されているのかが不明であった。そこで、この 37 の大腸菌プロモーターに対して、ストレス応答のように *B. longum* と共培養して短時間で誘導されるプロモーターがあるかどうかを調べた。もし短時間で誘導されれば、*B. longum* との混合によって直接発現誘導されるプロモーターであることが考えられる。まず PPT クローンが形質転換された大腸菌 DH5α を 96 穴平板プレートにて 200 μl の ABCM 培地にて好気条件下の 37°C で一晩前培養を行った。また、ビフィズス菌を 5 ml の ABCM 培地の入った試験管 3 本で窒素嫌気条件下の 37°C で一晩前培養を行った。次に、新しく用意した 96 穴平板プレートの各ウェルにビフィズス菌前培養液を 100 μl ずつ分注し、そこに各大腸菌前培養液を 100 μl 加え混合した。残りの大腸菌前培養液 100 μl の入ったプレートとビフィズス菌との混合培養液の入ったプレートの 2 枚を窒素嫌気条件下の 37°C で 1 時間共培養した。培養後、室温の好気下で 2 時間酸素にさらした後、あらかじめ ABCM 液体培地を

400 μ L 分注しておいた測定用チューブに測定する細菌培養液 100 μ L ずつを移して 5 倍希釈した。この試料溶液に対し、フローサイトメトリーFACS Calibur にて緑色蛍光強度を測定した。フローサイトメトリーは溶液にレーザー光を照射し、その透過光や散乱光、蛍光などを測定することで、溶液中の細胞などの微粒子 1 つ 1 つの大きさ、密度、蛍光強度などが測定できる。本実験では純粋培養及び共培養液中の 10 万個の微粒子の GFP の蛍光強度測定することで、*B. longum* との共培養後早期に発現する大腸菌プロモーターをスクリーニングした。

その結果、37 プロモーターのうち *proX* プロモーターのクローンにおいて、共培養時に単独培養よりも緑色蛍光強度が上昇した(Fig. 17)。また純粋培養でも共培養でも発現していない大腸菌プロモーターが 30 プロモーター(*bamA*, *cdsA*, *chaA*, *cheY*, *cusF*, *dcm*, *envR*, *eutH*, *fixC*, *glxK*, *htpG*, *lysC*, *macA*, *macB*, *malI*, *mdtM*, *mgtA*, *mlrA*, *mraY*, *proW*, *pstB*, *qseC*, *rpiR*, *serB*, *tus*, *yabQ*, *ydeH*, *ygaR*, *yiaG*, *yjjQ*)あった。この大腸菌 30 プロモーターは短時間の *B. longum* との共培養では発現せず、誘導されるのに時間がかかると考えられた。さらに、純粋培養でも共培養でも誘導されている大腸菌プロモーターが 6 プロモーター(*rpsB*, *rpsF*, *srlA*, *ycgZ*, *ygaU*, *yjbJ*)あった。この大腸菌 6 プロモーターはどれも純粋培養よりも共培養時の GFP の蛍光強度が下がっているように見えた。しかし実際は、共培養時の測定溶液には GFP を発現しないビフィズス菌も含まれており、また本実験では 1 つの測定溶液に対しフローサイトメトリーで 10 万個の微粒子の GFP を測定しており、その中に含まれる大腸菌の数は純粋培養に比べて相対的に減少することから、蛍光強度が低下しているように見えていいると考えられる。このことをふまえると、これら大腸菌 6 プロモーターは共培養初期では発現量に変化がなかったと考えられ、前述の大腸菌 30 プロモーターと同様に短時間の *B. longum* との共培養では発現せず、誘導されるのに時間がかかると考えられた。



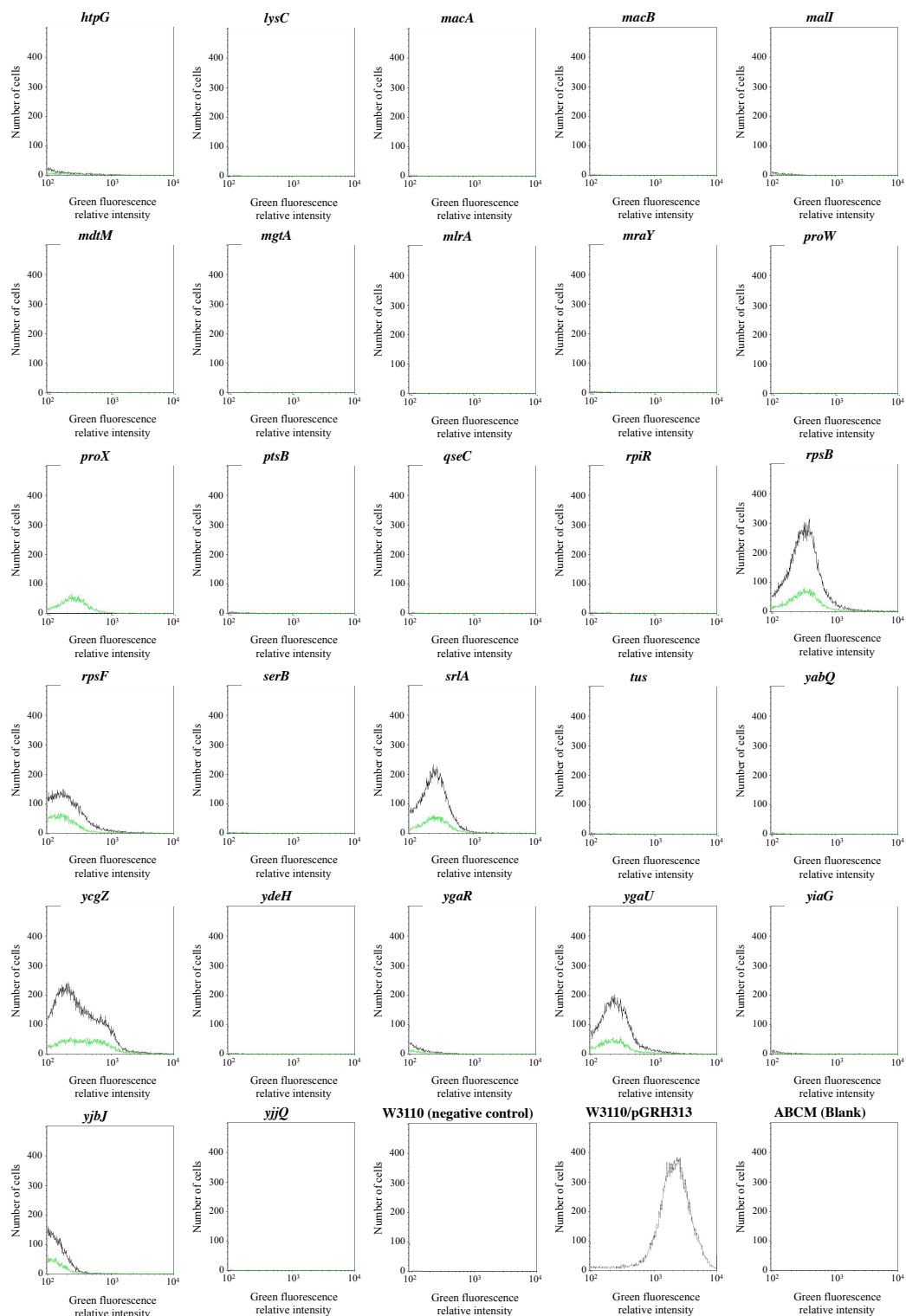


Fig. 17. *B. longum* との共培養早期に発現する大腸菌プロモーター

各 PPT クローンの大腸菌形質転換体の単独培養のヒストグラム (黒)と *B. longum* との共培養時のヒストグラム (緑)を比較した。ネガティブコントロールとして W3110 を、ポジティブコントロールとして W3110/pGRH313 を使用した。

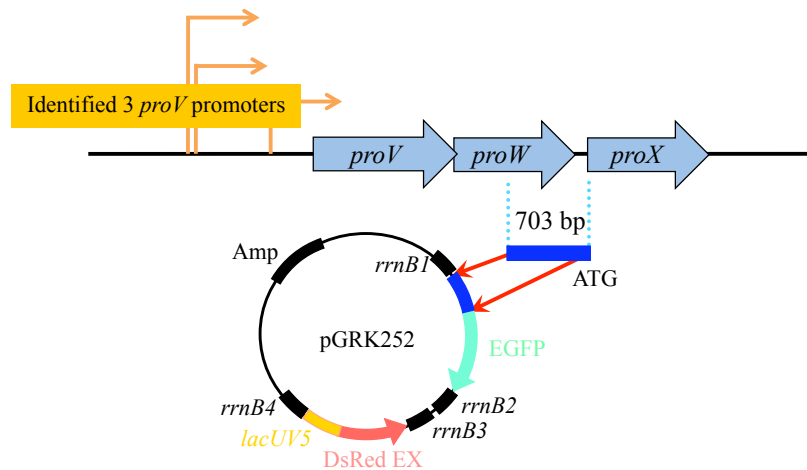


Fig. 18. *pro* オペロンのゲノム上構造と pGRK252 の構築図

proX は *pro* オペロンの最下流に位置しており、オペロンの先頭遺伝子 *proV* 上流に存在する 3 つの転写開始点から転写されている。しかし、pGRK252 は pGRP に *proX* の開始コドンを含む上流 703 bp がクローニングされたプラスミドであることから、この 703 bp の中にプロモーター領域があることが予測された。

3-3-3-2. *proX* プロモーターの転写開始点の決定

大腸菌 *proX* 遺伝子はグリシンベタイントランスポーターのサブユニットをコードしている(Barron et al., 1987)。また *proX* 遺伝子は大腸菌ゲノム上で *proV*, *proW* と共にオペロン構造をとっており、*pro* オペロンの最下流に位置している (Fig. 18)。オペロン構造から *proVWX* は同じ転写単位で転写されており、これまでに *proV* 上流に転写開始点が 3 つ同定されている(Gowrishankar, 1989)。しかし、本研究で用いた *proX* プロモーターの PPT クローンは *proX* の開始コドンを含む上流 703 bp をクローニングしたものであり、その *proX* プロモーターが *B. longum* との共培養早期において誘導されたことから、*proX* 上流にプロモーター領域があることが予測された (Fig. 18)。そこでプライマー伸長法にて転写開始点の決定を行った。まず PPT クローンの *proX* プロモーターがクローニングされた pGRK252 の形質転換体を 5 mL の ABCM 培地好気条件下で、*B. longum* を ABCM 培地窒素嫌気条件下で前培養した。次に 10 mL の ABCM 培地の入った 6 本の試験管に大腸菌前培養液を 50 μ L ずつ植菌し一晩好気条件下で培養を行った。また同様に *B. longum* も 3 本の試験管に 50 μ L ずつ植菌をして一晩窒素嫌気条件下の 37 $^{\circ}$ C で本培養を行った。培養後、大腸菌が培養された試験管 3 本には ABCM 培地を各 10 mL ずつ入れ混合し、残りの 3 本には *B. longum* の培養液を各 10 mL ずつ入れ混合してから窒素嫌気条件下の 37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養を行った。この 2 種類の培養細胞から total RNA を抽出した。次に吸光度から算出した濃度から計算した total RNA 2 μ g 分を 0.8% アガロース電気泳動で展開し、RNA の純度と濃度

を確認した。次に total RNA 40 µg に対してプラスミド上の GFP に対する FITC ラベルされたプライマー-EGFP-anti-FITC を用いて逆転写反応を行い pGRK252 の *proX* プロモーターから転写されている GFP の mRNA に対する cDNA を合成した。また上記の同 FITC ラベルプライマーを用いて、*proX* プロモーター周辺のシーケンスラダーも調製した。調製した cDNA とシーケンスラダーを蛍光自動 DNA 分析装置 DSQ-500L (島津製作所製)にて分析し cDNA のバンドの位置から転写開始点を決定した。

その結果、PPT クローンの大腸菌形質転換体単独培養由来の cDNA のバンドは確認できなかった。それに対し、*B. longum* との共培養由来の cDNA のバンドは確認できた(Fig. 19)。このことから *proX* プロモーターが *B. longum* との共培養時に転写レベルで誘導されていることが明らかとなった。また cDNA のバンドの位置から転写開始点は *proX* の開始コドンから上流 13 bp の位置の塩基 A であることが分かった。この新規転写開始点の上流にはプロモーター配列である -10 ボックスと -35 ボックスの配列も確認できた(Fig. 20)。

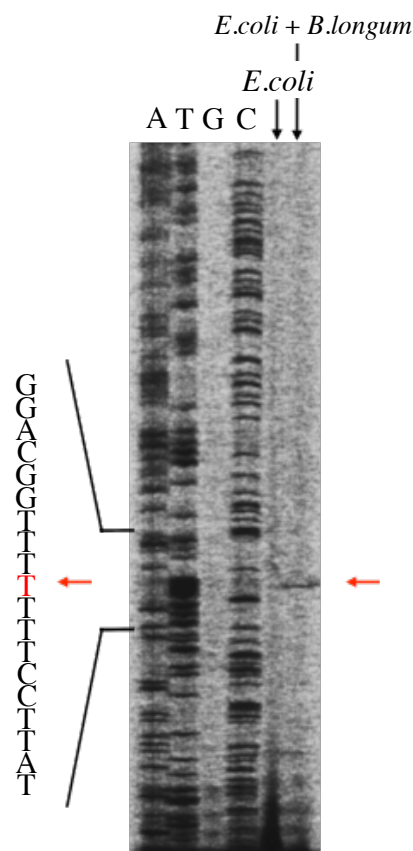


Fig. 19. プライマー伸長法による *proX* 転写開始点決定

大腸菌のみのレーンには PPT の *proX* クローン由来の cDNA のバンドが確認できないのに対し、*B. longum* との共培養時にはバンドが確認できた。

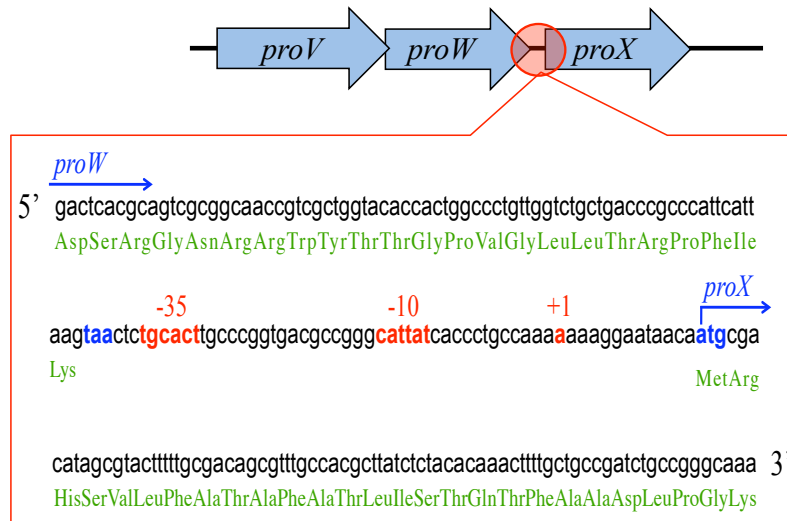


Fig. 20. *proX* 遺伝子の転写開始点とプロモーター領域

転写開始点は *proX* の翻訳開始点から上流 13 bp に位置する塩基 A であった。また転写開始点及び予測されるプロモーター領域を示した。

3-3-3-3. *rpoS*, *beaSR*, *cpxAR* の *proX* プロモーター発現への影響

proX プロモーターは *B. longum* との共培養時に早い段階から誘導されていることから、*B. longum* の存在に対しストレス応答で誘導されていることが考えられた。したがってストレス応答のレギュレーター遺伝子が *proX* プロモーターの誘導に関与していることが考えられた。*proX* プロモーターの誘導に関与しているレギュレーター遺伝子としてまず考えられたのが *rpoS* である。*rpoS* は σ^S をコードする遺伝子であり、また σ^S は定常期におけるストレス応答のグローバルレギュレーターのひとつである(McRobb et al. 2002)。さらに大腸菌が直接 *B. longum* の存在を感知するには表層ストレスなどに関係したセンサー蛋白質の関与が考えられた。大腸菌では表層ストレス応答の二成分制御系の *beaSR*, *cpxAR* が考えられた(Mone et al., 2009; Otto, and Silhavy, 2002)。

上記の 3 つのストレス応答性のレギュレーターからの制御を受けているか、野生株と *rpoS*, *beaSR*, *cpxAR* 遺伝子欠損株における *proX* プロモーターの発現を比較することで調べた。*E. coli* BW25113 (WT), *E. coli* JW5437 ($\Delta rpoS$), *E. coli* BW27553 ($\Delta beaSR$), *E. coli* BW27559 ($\Delta cpxAR$)のコンピテントセルを作製し *proX* プロモーターがクローニングされた pGRK252 を形質転換した。この形質転換した大腸菌株を ABCM 培地 5 mL を入れた試験管 2 本にて好気条件下の 37°C で一晩前培養した。また *B. longum* を ABCM 培地 5 mL にて窒素嫌気条件下の 37°C で一晩前培養した。培養後、大腸菌株培養液 5 mL を ABCM 培地 5 mL 及び *B. longum* の培養液 5 mL とそれぞれ混合し、窒素嫌気条件下の 37°C で培養した。培養中、経時的に培養液 200 μ L をサンプリングして 96 穴平板プレートに移し、

蛍光プレートリーダー(コロナ電気製 MTP-880)にて緑色蛍光強度を測定した。得られた各サンプルの蛍光強度の値からバックグラウンドである ABCM 培地の蛍光強度の値を引いた後、欠損株で蛍光強度を WT の蛍光強度で割ることで蛍光強度比を求めた。

その結果、混合してから 24 時間共培養したが野生株と各遺伝子欠失株で蛍光強度に差異はなく、発現量に変化は見られなかった(Fig. 21)。このことから *rpoS*, *beaSR*, *cpxAR* は *proX* プロモーターの誘導に関与していないことが明らかになった。

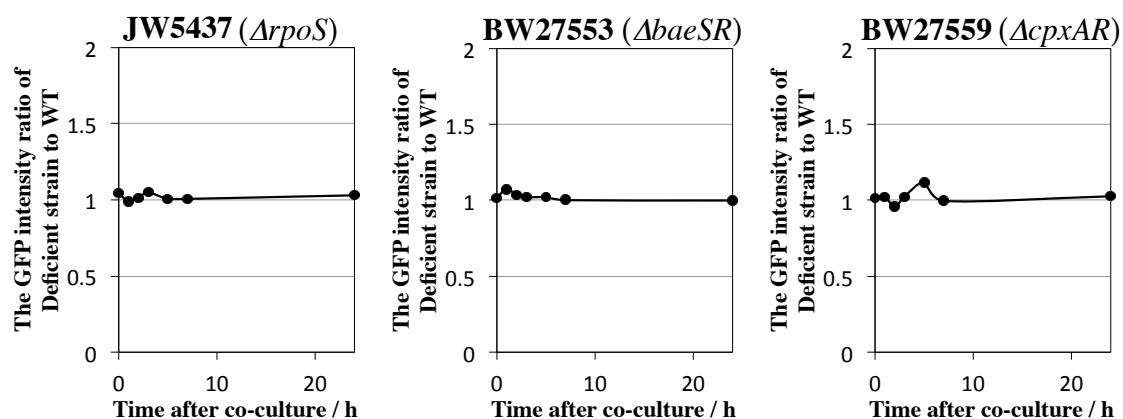


Fig. 21. $\Delta rpoS$, $\Delta beaSR$, $\Delta cpxAR$ 株における *proX* プロモーター活性

B. longum 共培養時における各遺伝子欠損株の *proX* プロモーターの活性は野生株と変化なかった。

第4章 考察

4-1. 大腸菌 W3110 と各種ビフィズス菌の共培養で形成される細菌叢

大腸菌 W3110 とビフィズス菌株の増殖速度及び培養液 pH は菌種ごとに異なり、またビフィズス菌の方が培養液の酸性度が高い結果となった。大腸菌は通性嫌気性菌であり好気条件、嫌気条件にかかわらず生育できたが、ビフィズス菌は菌種によって増殖速度が大腸菌と同程度の速度の種と増殖に時間のかかる種が観察された。この理由としてビフィズス菌の菌種間での生育環境の違いが考えられる。ビフィズス菌は偏性嫌気性菌である為、通常は腸内のように嫌気性条件下でないと生育できないのだが、菌種によっては口腔内などからも単離されている菌種もあり、比較的好気に近い環境で生育できる場合もある。このように適応できる環境が菌種ごとに違うことから、今回液体培養に用いた ABCM 培地での培養にも適応しやすい菌種とそうでない菌種がいたと考えられる。またビフィズス菌の培養液の酸性度が高くなることもビフィズス菌が大腸菌と異なる偏性嫌気性細菌であることに起因していると考えられる。それはビフィズス菌がエネルギー代謝に酸素を利用することができない為、乳酸発酵によってエネルギーを得ており、酸素を利用するよりもエネルギー効率が悪い。その為、ビフィズス菌の増殖速度が大腸菌に比べ遅くなると考えられる。また、乳酸発酵の過程で乳酸と酢酸を産生する為、ビフィズス菌培養液は大腸菌より酸性側にシフトしている。

次に大腸菌 W3110 と各ビフィズス菌の共培養行い、その共培養液中における各菌の生菌数を CFU/mL で算出した結果、大腸菌とビフィズス菌の植菌細胞数に最大 10000 倍近くの差があるにもかかわらず定常期まで共培養を行うとビフィズス菌種との共培養において各菌の生菌数の差は 10 倍未満になった(Table 4)。特に、単独での増殖速度が大腸菌に比べ非常に遅かった *B. pseudolongum* との共培養においても、定常期まで培養すると大腸菌とビフィズス菌間の生菌数の差はほとんど見られなかった。この結果は共培養液中では大腸菌とビフィズス菌がその増殖速度に関係なく特定の細菌叢に落ち着くことを意味しており、大腸菌とビフィズス菌間で何らかの相互作用が起きていることが示唆された。

4-2. *B. longum* と共存時の大腸菌の応答機構

PPT クローンを用いビフィズス菌 *B. longum* との共養時に発現が上昇する大腸菌プロモーターを探索した結果、37 の大腸菌プロモーターが誘導された。これら発現が上昇したプロモーターを分類すると、細胞外物質を感知するセンサー蛋白質や物質輸送に関わるトランスポーターやアンチポーターなど膜に存在す

る蛋白質遺伝子のプロモーターが 13 種類、酵素が 7 種類、転写因子などのレギュレーターが 6 種類、その他が 3 種類、機能未知遺伝子が 8 種類含まれていた (Table 5)。特にトランスポーターやアンチポーターといった膜蛋白質遺伝子のプロモーターが多く誘導されていることから、*B. longum* 存在下では大腸菌は積極的細胞外と物質のやりとりを行い、外部環境を感知しようと振る舞っていることが考えられた。しかし、ビフィズス菌の培養上清由来の CM ではこれらのプロモーターは誘導されなかった。その理由として CM を作製した際に、酸性であった培養液を中性まで調整したことが考えられる。つまりこれらの膜蛋白質は酸性度によって誘導されており、中性条件下では誘導されないことを示唆している。またいくつかの機能未知遺伝子の発現も上昇しており、これらの遺伝子の中に *B. longum* との細胞間コミュニケーションに関わる遺伝子が含まれていることも考えられる。

ビフィズス菌 *B. longum* との共培養で発現が上昇した 37 プロモーターのうち *B. longum* の CM で *yjbJ* プロモーターが誘導された (Fig. 15)。この結果から、*yjbJ* プロモーターは QS のように培養液中に放出される何からの物質によって誘導されていることが示唆された。またこの *yjbJ* プロモーターは大腸菌及び他のビフィズス菌 CM でも誘導され、グラム陰性菌とグラム陽性菌の間で幅広く起きる QS であることが考えられた。現在、グラム陰性菌とグラム陽性菌間の QS を媒介するシグナル分子の前駆体を合成する蛋白質として LuxS が報告されている。この LuxS をコードする *luxS* は細菌の種を問わず幅広く保存されており、本研究に用いた菌株のほとんどがこの *luxS* を持っている。しかし、QS によって誘導されていると考えられる *yjbJ* プロモーターであるが、*luxS* 遺伝子をゲノム上に持っていない大腸菌 DH5 α の CM で誘導された。また逆に *luxS* 遺伝子をゲノム上に持っている *B. pseudocatenulatum* と *B. pseudolongum* の CM では誘導されなかった。これらの結果から、*yjbJ* プロモーターの誘導は既存のグラム陰性菌とグラム陽性菌間 *luxS* の関与する QS とは異なる QS システムであることが示唆された (Fig. 22)。

B. longum との共培養後早期に発現する *proX* プロモーターは菌体内外の浸透圧調整に関係しているグリシンベタイントランスポーターのサブユニットをコードしている。機能としてはグリシンベタインを認識するトランスポーターのセンサーを担っている。しかし、*proX* プロモーターは *B. longum* の CM では誘導されなかったことからビフィズス菌の分泌する化合物を感知しているわけではないと考えられ、*proX* プロモーターの誘導には大腸菌体の近傍に *B. longum* 菌体の存在が必要であることが示唆された。 (Fig. 22)。また *pro* オペロンの下流の遺伝子である *proX* のみが *B. longum* との共培養で、ストレス応答のように誘導されていたことから、トランスポーターとして機能しているわけではないことが

示唆された。さらに *pro* オペロン上流だけでなく *proX* 上流にもプロモーター領域があることが示唆された。そこでプライマー伸長法にて転写開始点の決定を行った結果、転写開始点は *proX* の開始コドンから上流 13 bp の位置の塩基 A であることが分かった。また転写開始点の上流に -10 ボックスと -35 ボックスの配列も確認できた。このことからオペロン構造をとり同じ転写単位で転写されている遺伝子群の中でも、別の機能の為に単独で転写される遺伝子があることが示唆された。さらに *proX* プロモーターは *B. longum* との共培養 1 時間で誘導されたことからストレス応答のように誘導されるプロモーターであると考えられたが、*B. longum* との共培養後ではストレス応答性のレギュレーターである *rpoS*, *beaSR*, *cpxAR* の制御を受けていないことが明らかとなり、*proX* プロモーターはストレス応答として *rpoS*, *beaSR*, *cpxAR* によって誘導されているのではなく、何らかの別の作用で誘導されていることが考えられた。

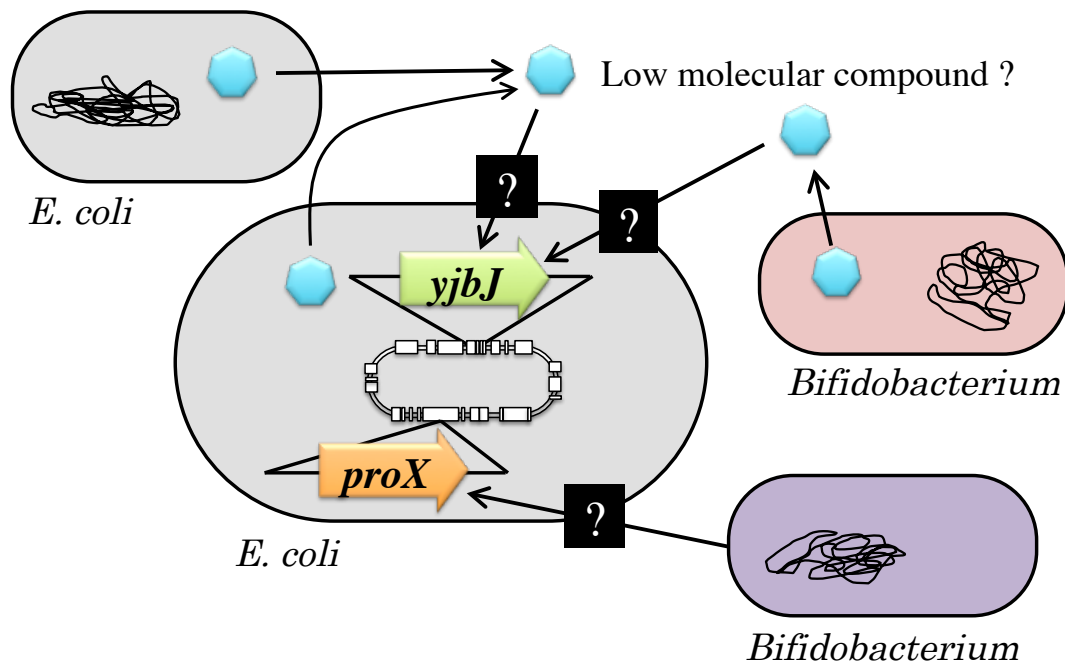


Fig. 22. 大腸菌と *B. longum* 間の細胞間コミュニケーションシステムモデル

大腸菌 *yjbJ* プロモーターは大腸菌及び、ビフィズス菌が菌外に放出する既存の AI-2 とは異なる低分子化合物によって誘導される。また、大腸菌 *yjbJ* プロモーターの誘導にはビフィズス菌体そのものが必要である。

第5章 参考文献

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K., Tomita, M., Wanner, B., and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 1-11.
- Barron, S., Jung, J., and Villarej, M. (1987) Purification and characterization of a glycine betaine binding protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262, 11841-11846.
- Bassler, B. and Losick, R. (2006) Bacterially Speaking. *Cell* 125, 237-246
- Blattner, F., Plunkett III, G., Bloch, C., Perna, N., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J., Rode, C., Mayhew, G., Gregor, J., Davis, N., Kirkpatrick, H., Goeden, M., Rose, D., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462.
- Gowrishankar, J. (1989) Nucleotide Sequence of the Osmoregulatory proU Operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 1923-1931.
- Haldman, A. and Wanner, B. (2001) Conditional-Replication, Integration, Excision, and Retrieval Plasmid-Host Systems for Gene Structure-Function Studies of Bacteria
- Jishage, M. and Ishihama, A. (1997) Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* W3110. *J. Bacteriol.* 179, 959-963.
- Makinoshima, H., Nishimura, A., and Ishihama, A. (2002) Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Mol. Microbiol.* 43, 269-279.
- Mcrobb, L., King, T., and Ferenci, T. (2002) *rpoS* Mutations and Loss of General Stress Resistance in *Escherichia coli* Populations as a Consequence of Conflict between Competing Stress Responses. *J. Bacteriol.* 184, 806-811.
- Miller, M. and Bassler, B. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165-199.
- Miyawaki, A., Nagai, T., and Mizuno, H. (2003) Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 557-562.
- Mone, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A., and Boulloc1, P. (2009) Global Analysis of Extracytoplasmic Stress Signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics* 5, e1000651.

- Nealson, K., Platt, T., and Hastings, J. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104, 313-322.
- Ormö, M., Cubitt, AB., Kallio, K., Gross, LA., Tsien, RY., and Remington, SJ. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B., Mori, H., and Mizuno, T. (2002) Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 46, 281-291.
- Otto, K. and Silhavy, T. (2002) Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *PNAS* 99, 2287-2292.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M., Berlyn, M., Blattner, F., Chaudhuri, R., Glasner, J., Horiuchi, T., Keseler, I., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N., Plunkett III, G., Rudd, K., Serres, M., Thomas, G., Thomson, N., Wishart, D., and Wanner, B. (2006) *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot—2005. *Nucleic Acids Res.* 34, 1-9.
- Sperandio, V., Torres, A., Jarvis, B., Nataro, J., and Kaper, J. (2003) Bacteria–host communication : the language of hormones. *PNAS* 100, 8951–8956.
- Zhou, L., Xiang-He L., Bochner, B., and Wanner, B. (2003) Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J. Bacteriol.* 185, 4956-49572.
- 青木 皐 (2004) 人体常在菌のはなし. 集英社

第6章 謝辞

本論文は筆者が法政大学大学院工学研究科物質化学専攻に在籍中に行った研究成果をまとめたものである。本研究を行うにあたり終始適切なご助言を賜り、また丁寧に指導して下さった法政大学生命科学部山本兼由准教授に深く感謝の意を表する。また本研究を共同研究としてビフィズス菌株の提供及び数多くの助言を賜った麻布大学獣医学部森田英利教授、ならびに PPT クローンなどの提供を賜った法政大学生命科学部石浜明教授に深く感謝の意を表する。さらに法政大学生命科学部川岸郁郎教授には副査としてご助言を賜った。ここに深く感謝の意を表する。法政大学生命科学部教育技術嘱託の市原正樹氏には透過型電子顕微鏡による細菌細胞の観察を行うにあたり、顕微鏡の使用方法を指導して戴いた。ここに深く感謝の意を表する。法政大学生命科学部小笠原寛博士、寺本潤博士、島田友裕博士には各種研究機器の使用法、ならびに実験試薬の調製法などの指導を賜った。深く感謝の意を表する。2009 年度法政大学工学部生命機能学科卒業の村田侑子氏、2010 年度法政大学工学部生命機能学科 3 年の加藤拓弥氏には実験データを提供して戴いた。ここに両氏に深く感謝の意を表する。法政大学生命科学部ゲノム生物学研究室の各位には研究遂行の為、日頃より実験機器などの使用に際し協力して戴いた。ここに深く感謝の意を表する。最後に、これまでの研究生活を支えてくださった家族に深く感謝の意を表する。

Table S1 PPTにクローニングされた大腸菌プロモーターと構築に用いたプライマー

PPT No.	Cloned gene name	S-Primer			T-Primer		
		Name	S primer sequence (5'→3')	length/mer	Name	T primer sequence (5'→3')	length/mer
H001	<i>yydH</i> (JW1596)	H001S	TATGTGATGCATGAAAACTCCTTATGGGA	30	H001T	ACTATCGAGATCTATGAATTCACATCTGAC	30
H002	<i>yleN</i> (JW1430)	H002S	GAGATATGCATCGCACTCCTCCGCAAAA	30	H002T	AGCGTAAAGATCTCCCGCAAGCATCGCCG	30
H004	<i>argO</i> <i>ysgA</i> (JW2890)	H004S	CGATGCATGTTGGATATCCGAAATGAATC	32	H004T	GAAGATCTCAGACGGTAAATATGTTATCC	33
H005	<i>yyjC</i> (JW4288)	H005S	CGATGCATAATGTTACCTTTTATGAGTATTCAC	35	H005T	GAAGATCTTTTCCATAGCCATTCCTTTTG	31
H006	<i>yyjD</i> (JW5782)	H006S	GAAGATCTTAAAGGTAGGAAACACTCTAAAG	32	H006T	CGATGCATTTTGGCACTCTCTGAC	24
H007	<i>torY</i> (JW1862)	H007S	CGATGCATAGATTCCTCTAATTAATTAATCGG	32	H007T	GAAGATCTCAAGGATGTGTCATGTCATCAG	30
H008	<i>yfaL</i> (JW2227)	H008S	CGATGCATATAATCTAACCATCTTTCTATAAG	35	H008T	GAAGATCTGGAAGGAAAAAGTGGCTTTCG	29
H009	<i>nrkA</i> <i>ldnA</i> <i>F</i> (JW2228)	H009S	GAAGATCTACGGCGTATTAATCGCATATATAC	32	H009T	CGATGCATGTATGTGCTGACTGTGTTTTG	28
H011	<i>fimE</i> (JW4276)	H011S	GAAGATCTTATCGTCATACCTGTCTGGTATAC	32	H011T	CGATGCATAATGATGACTACTCTAACTG	28
H027	<i>yeaM</i> (JW1779)	H027S	CTGTGTGATCATTTTGTCCGAACCTAGCGA	30	H027T	TTTAATTAGATCTGGCAGTAAGACATTGCC	30
H028	<i>yeaW</i> (JW1780)	H028S	GGTCAAGATCTCAGCACCGCTGAGTCGTGC	30	H028T	TGAACAATGCATATGCTCTCTCATGTGTACA	30
H032	<i>yzgJ</i> (JW3390)	H032S	CGATGCATATTTCTTCCATCTTTTGAATGG	33	H032T	GAGGATCCCGACCTTAGCTGCTTAATG	28
H033	<i>yejY</i> (JW5804) [1320]	H033S	CGATGCATGGAGTTGTGCGGTCTG	23	H033T	GAAGATCTAATATCAATTCAGGATGGGATTC	33
H034	<i>ymjC</i>	H034S	CGATGCATGAAAAATATCCAGGATTAATGGC	31	H034T	GAAGATCTCGTTGAAGCGGGTCAAC	27
H035	<i>mpcA</i> (JW1319)	H035S	CGATGCATATCCTTTCTTCAACGCTATGTC	31	H035T	GAAGATCTGCTTACCATATGGCGGAAG	28
H036	<i>yejZ</i> (JW1321)	H036S	GAAGATCTCAATTCGGGTATGTGTCAC	27	H036T	CGATGCATTCAGTATCTCATGCAATC	27
H037	<i>fliB</i> (JW3003)	H037S	CGATGCATGTTTAAACGGTTTATTTGTATAAAATCAG	41	H037T	GAAGATCTTATTGAACATGGCAAGCTTAAG	31
H038	<i>rfaG</i> (JW3607)	H038S	CGATGCATCTTATGACACGAGGATTTTTG	29	H038T	GAAGATCTCAGATCAGCGGGCTGAATAAG	28
H039	<i>ompG</i> (JW0423)	H039S	CGATGCATGGCGCTCTACAGG	21	H039T	GAAGATCTGGTCAACGTAAGCAATTAAG	29
H078	<i>ymcC</i> (JW0969)	H078S	AAGAGGATGCATCTTAATCTTGAAGAGT	30	H078T	GAACAAGAGTCTTCTGCAACTCTTAGGC	30
H087	<i>mug</i> <i>imgA</i> <i>ch</i> <i>GhisD</i> <i>yaaG</i> (JW0008)	H087S	GAAGATCTCCGATAAGAAAGATGACCTCC	30	H087T	CGATGCATCAAGATTTTCCCGTTTAAACAGCTCTG	35
H089	<i>yaaW</i> <i>htgA</i> <i>hlyY</i> (JW0010)	H089S	CGATGCATTTTGTGGCTCTATATCTGGCG	33	H089T	GAAGATCTAATCTTCTCTTATCAGCAGTAACTA	35
H097	<i>lspA</i> <i>ldpA</i> <i>BileS</i> (JW0025)	H097S	GAAGATCTGAAGTGTGGGCTACCTCCCGCG	30	H097T	CGATGCATCAGGCAAACTACGTTTTTCACCG	32
H098	<i>flpB</i> <i>ldpA</i> <i>yaaD</i> (JW0026)	H098S	GAAGATCTCCCGCTGTCCGCTGCCTTAATC	31	H098T	CGATGCATCGAGGTTTGCTCTTATTAATGAAG	32
H104	<i>cauC</i> <i>yaaM</i> (JW0036)	H104S	CGATGCATTTTGTGCTGTTGTATGGCGGGCG	35	H104T	GAAGATCTCTTAAAGATTAATGGCTCGCAC	31
H105	<i>cauB</i> <i>yaaN</i> (JW0037)	H105S	CGATGCATTAITGCTCCTCGAAAAATTAATGAGCGC	37	H105T	GAAGATCTGATGGCGCGCTACGCCAATC	30
H106	<i>cauA</i> <i>yaaO</i> (JW0038)	H106S	CGATGCATCTTCAACCTCTGATATTTGGGGG	34	H106T	GAAGATCTTCGGCATGTGTCTGGGCTGACAGCG	34
H107	<i>fixB</i> <i>yaaR</i> (JW0041)	H107S	CGATGCATAGCATCCCCGTAAATTAATGAC	31	H107T	GAAGATCTCTGCCGCAACAACGGCGAGCGC	31
H108	<i>fixC</i> <i>yaaS</i> (JW0042)	H108S	GAAGATCTACGCACACGTGGAGTGCAAGCG	31	H108T	CGATGCATAAGAGCTCCCTGTACGGCGAAGGCC	34
H109	<i>fixX</i> <i>yaaT</i> (JW0043)	H109S	GAAGATCTCCGGCGTGTGCACCGCTGATGC	30	H109T	CGATGCATAAAGCGGTCACTCTTTATGCCC	31
H121	<i>yuhP</i> (JW0056)	H121S	GAAGATCTGATAAACAGACTAGGCTTATA	30	H121T	CGATGCATGGTAGCACCGTCCAGTTAGCACCG	33
H125	<i>sgtR</i> <i>yaaN</i> (JW0068)	H125S	CGATGCATAAAGGGGGAACCTCTGTGCAAAAG	32	H125T	GAAGATCTATAGCATTCACCGTATAAAGAGGCC	34
H135	<i>mraY</i> <i>mraX</i> (JW0085)	H135S	GAAGATCTAATCGCTGGCAGCCGCTGGCG	30	H135T	CGATGCATGTCCCATCTCTCTGTAAGCGCG	31
H138	<i>murG</i> (JW0088)	H138S	GAAGATCTACCGCATCTTGGAAACCGTGGGAAGA	34	H138T	CGATGCATCGTGAACCTCGTACAAACGCTCGGCG	34
H139	<i>murF</i> (JW0089)	H139S	GAAGATCTCTGGGTGATTCAGTCACTATGGCG	33	H139T	CGATGCATCTTTACGCCATTAATCTCTTA	30
H140	<i>ddiB</i> <i>ldi</i> (JW0090)	H140S	GAAGATCTGACTGGTGGCGCTTTTGATTTCTCTCGG	35	H140T	CGATGCATGTGTTTCTCTCTCCGAGTTGTGCGCG	32
H152	<i>yaaH</i> <i>agaX</i> (JW0125)	H152S	GAAGATCTGCAATTCAGTGTTTTGTGTCG	31	H152T	CGATGCATCGCTTCTCTCTAGCCGAAATCT	32
H154	<i>yaaH</i> (JW0131)	H154S	CGATGCATTTTACTCCAAATGTTCTTATGCG	32	H154T	GAAGATCTCCAGGTTAATATGATCTGGCG	31
H156	<i>yaaH</i> (JW0134)	H156S	CGATGCATTTGACGTCCCTGTAGTTACTG	30	H156T	GAAGATCTTCAGTGCTCAAGGAGCCGCA	30
H162	<i>cdsR</i> <i>ndaR</i> <i>yaaG</i> (JW0158/JW0153)	H162S	GAAGATCTCAGCAAACTGACCTGGGCTTAC	31	H162T	CGATGCATAAGTCTCCGTTATGACCGGCT	31
H163	<i>yaaH</i> (JW0159)	H163S	CGATGCATAGCGTTTACTCAAAATGAAGTCAG	31	H163T	GAAGATCTTTCGAATGGTAGGCATCGTG	30
H313	<i>ygtJ</i> <i>W</i> 2989)	H313S	CGATGCATTGACTCTCTTATTAATCATGATGCTCTC	35	H313T	GAAGATCTCTCTGACTCCAGTCTCCCTTAATAATTC	35
K001	<i>dnaK</i>	K001S	GAATATCTAAGATCTGACTGGCGCTA	26	K001T	TATTTATGCACTTAAACGCTTCCAC	26
K002	<i>dnaJ</i>	K002S	AAGCACAGCGAGATCTCTCTACCCTGAA	30	K002T	CTTGCTTAATGATCTTTTAAATTGCCCC	30
K007	<i>polB</i>	K007S	CTCGCTGATGCATGCTGAAAATCCATC	28	K007T	CTTTGTGATCAGATCTTCGGCGCTGAT	28
K010	<i>ppaD</i>	K010S	CCGGGTGCTTATGCATCTGTTTCGCTCT	30	K010T	CCCTTTCAGGAAGATCTAGTAAGGTACGCC	30
K014	<i>hemL</i>	K014S	CAGACTATGCAATGGAGGGTTCTTGATTCG	30	K014T	CCCCTTAGATCTCCGGGATCCCGCAACCAC	30
K015	<i>lpsA</i>	K015S	CCGTTTCCAGATCTTACTGGTGGATCGCGT	30	K015T	GGATTTATCATGCATGTATCAGGCTCTCCG	30
K017	<i>dnaQ</i>	K017S	ACTGGTTTATGATCTGCGGTTTCCAGCCA	30	K017T	ATTGCAATGATGCATAGCGGTCTATATGTC	30
K018	<i>dnaI</i>	K018S	AACCGGTTAGCATGCATTGGGATCTCTCT	30	K018T	GGAGCAGGAAACAGATCTGGATGCTGTTTT	30
K019	<i>dnaP</i>	K019S	ATGGAAGCAGATCTGGAGATGGAGATGTT	30	K019T	TGATTTTATGCATGCTCACCTCTCAACAC	30
K027	<i>mhpT</i>	K027S	CGCGAAACCGGTAGATCTGGATACGCTGGT	30	K027T	TGAATCCGCACTGATGCATTCGCAAGCCGCG	30
K030	<i>phoB</i>	K030S	GAGCGAAGATCTGCGGCGATGTCGCGCGC	30	K030T	CGTCTATGCATGATTTGCCCTGTGTAAATA	30
K031	<i>phoR</i>	K031S	GGCTTAGATCTGGTCAAGCGGAAGATAT	30	K031T	CGTTTATGCATGTAAAGATCTCCAGTTAAG	30
K035	<i>yajR</i>	K035S	TCGTTTATGATGATCTGTTTAAATTCG	30	K035T	GCTGTGGCAGATCTCTCACTCTAGT	27
K037	<i>mdfA</i>	K037S	CGGAATAACGAGATCTCTTCCAGACC	27	K037T	GAGCAATAAATAGCATGCGTGTGTCTCTGA	30
K039	<i>acrA</i>	K039S	TGTTTACTATGATGATGGAAGTCACTT	30	K039T	CCCACCAAGATCTATACCGCGAAATCA	27
K041	<i>prcC</i>	K041S	GCAGGGCGGATGATGATGATAAGACCTCAAT	30	K041T	CCCCATGAGATCTGGACGAACACAGAGAGAAA	30
K042	<i>ybaL</i>	K042S	GCGGGGTGGCGTATGATCTCGTCTCCTT	30	K042T	GCTATTACAAGATCTATGATGCAAAAAT	30
K043	<i>fsr</i>	K043S	TGTTTACTATGATGATGGAAGTCACTT	30	K043T	CCCACCAAGATCTATACCGCGAAATCA	27
K049	<i>fimZ</i>	K049S	CGTTGGATGCATAGTTTACCAGTCTCATAGG	30	K049T	GTGATAGATCTGGCAAGCATCACAAATGGG	30
K050	<i>emrE</i>	K050S	CTCGGTGGAGATCTTCTTTCATTCG	26	K050T	ATAAAGGATGATGATATGCTGCTGTTTT	30
K051	<i>ybaR</i>	K051S	CATTTTATGCATGGTGTATCCCGATGCT	30	K051T	GTGTGAAGATCTAAATCTCAAGAAATACG	30
K052	<i>yleA</i> <i>casR</i>	K052S	CAACGAGATGCATATTCCTCCGATGTGTC	30	K052T	CGCGATAGATCTGTGCTGATGTAATAATGC	30
K053	<i>yleB</i> <i>casC</i>	K053S	GCTGAAGAGATCTACCATAAATCGGC	27	K053T	GTTTACAAGGATGATAGGCTATAATTTCT	30
K054	<i>yleC</i>	K054S	CAGTAGAGATCTATCGTCAATTATTAACGC	30	K054T	GCAGTGCTTATGCAATTATCTCTCTCGG	30
K062	<i>cisA</i>	K062S	AGATGAGATCTGTGCCGCTCATAGCGGAGG	30	K062T	AAGCTGATGCATGTGTTTCTTGCGGGTGT	30
K065	<i>nagA</i>	K065S	GGGTTAAGGCATGCATCTGACCCCCGATT	30	K065T	CGTTAGTAGATCTGCATAAAGCAGGCGCAGG	30
K066	<i>sepA</i>	K066S	TAGCCCAAGATCTCAATGACGCGCGTA	30	K066T	CAATCGTAGCATCTTAATCCAGTGCAGTG	30
K067 (N)	<i>speF</i>	K067S	GCAATTTTAAATTAATGATTTTTCATCTC	30	K067T	GTGCAACACAGTAGATCTTTGCGTATTTAT	30
K068	<i>hlpD</i>	K068S	TCGTTATGCATCAAGTTTATCCAGCGCCAG	30	K068T	GCGTGAGATCTAAACCGCTTACCGCTCTG	30
K069	<i>ldpA</i>	K069S2	ACCCTTGGCATGCATCAGAACGCTCCGC	30	K069T2	ATAAAAATCAAGATCTGCTTTTCCGCTCG	30
K070	<i>yhbA</i>	K070S	GCTATCCCTGAAGATCTTAACATGCTGG	28	K070T	CGTTGTAGATGATTAATGCTCTGAGC	28
K071	<i>yhbL</i>	K071S	CATGCAGCACAGATCTCAAGTGGGATTG	30	K071T	TTCAAGTCAATATGATTTGTGACGCGCGCA	30
K074	<i>msdF</i>	K074S	TGCAACGAATGATTTTATATCCCACTTG	30	K074T	CTCTGCGCCGAGATCTCACTTTTCTACT	30
K076	<i>uvrB</i>	K076S	CGAGCGAGATCAGATCTTCGATTGACTGCA	30	K076T	ACGGTTTATGCATGATGCTGCTACTGGAAG	30
K079	<i>dinG</i>	K079S	ACCATGACCAAGATCTCCCCAGTAAGCATC	30	K079T	CGCGCGGTTAAATGCATGAGAAACCTTGA	30
K085	<i>mdfA</i>	K085S	CGGAAAAAGATCTCCCATGCTCCAG	25	K085T	CTAATTTATATGATGCAATTTCTCTGCC	30
K087	<i>mucA</i> <i>Z1383</i>	K087S	TATCTATTGAGATCTTCAATGTCAGCTCAA	30	K087T	ATACTCCAATATGCATCCGGGTCTTAAC	30
K089	<i>fxcA</i>	K089S	GGTTTGCAGCATGCATAACTCTCTCTT	30	K089T	GGACCGAATGATGATCTGGAGTTTAATCAT	30
K090	<i>himD</i>	K090S	GAACGTGAACAGATCTCCCTGGGCGTTAAA	30	K090T	TCCTGACTTATGCATGATCTCCGGGTCTT	30
K091 (N)	<i>ycal</i>	K091S	CTATCACTGAAGATCTTATCTTCACTCGCT	30	K091T	ATTCTGACTTATGCATGATCTCCGGTCTC	30
K092 (N)	<i>ssaE</i>	K092S	GGGTGATGACATGCATCACTCTCTCTATA	30	K092T	CACGTTTGAAGATCTTCAGATGAGCGCTG	30
K093 (N)	<i>yleY</i>	K093S	AGATCACTGAAGATCTCTTCGTAGCAAGA	30	K093T	CAAAACAGAGAATGCATTCGCTCACTTTAC	30
K094	<i>hesD</i>	K094S	GCTTGGCTGAGATCACCAGATACCAGCGCA	30	K094T	GCTTTAGATGATGACTCTGTAGATCCAC	30
K095 (N)	<i>ycsA</i>	K095S	TAAACAATGATGATTAAGTCACTCTCTA	30	K095T	CACGTCTCTCAGATCTGGCAACCGCGAGG	30
K096	<i>torS</i>	K096S	GGCAAAATGCATCAGAGCTTCTGGGTACG	30	K096T	CCGCGAGATCTTGCGCGAAAACTCTGACC	30
K097	<i>torY</i>	K097S	GTGATGATGCATCAGAGGGTTTACTCATTT	30	K097T	ACTGCAGATCAAGCGCTACTCATATCTAG	30
K098	<i>putP</i>	K098S	GTGATCGCGAGATCTAAACCGACTGGGCG	30	K098T	GTGTGCTAATATGCATCAAAAGTCTCCAAA	30
K099	<i>ycsE</i>	K099S-1	TTTACAGGAGTGCATAGCAATCCGCTGTT	30	K099T	CGACCGCAAGATCTAAAAGGCATGATTA	30
K100	<i>dinI</i>	K100S	GGTGACTTCAATATGCATAATAGCCCCCTG	30	K100T	TCACTCCGAGATCTGATGTTTAAACCGCA	30

K101	yqjV	K101S	GACACCGCATGCAATTCCTCCCTCCC	24	K101T	AGGCAATGAAAAGATCTACGAACAACATTTGG	30
K102	pubC	K102S	TGGCAAAAGATCTGCGTGATGCAGGCATTG	30	K102T	GACCGTTAATTAATGCATACCGGCTCTT	30
K104	mjlJ	K104S	CGATATTGTTCAATGCAATAACGGTTGTGAGA	30	K104T	TTCTTTGCTTACAGATCTGGCGTCCGGTGC	30
K105 (N)	yqjU	K105S	ACAATTAACGAGATCTATACCACAAGCTG	29	K105T	CGACAGGTTGATGCATGAAATCCGTTCTGGT	30
K106 (N)	poaA	K106S	TTTTACTCTGATGCATGTAACGCAACCGGA	30	K106T	GCAATACCGCAGATCTGGTCATGATCTTCGT	30
K107	phoP	K107S	AGTACATGCAATTTTATTTCTCCCTGTCTT	30	K107T	CGCTGAGATCTTGACCTGACCGACTCTACC	30
K108	mcrA	K108S	TGCGCAGGTGAAGATCTGGTGTCTGGAAG	30	K108T	CACCATCTCTTCCACTATCGAACAACCTCAG	30
K109	umuC	K109S	ATTATAAAGATCTAATGCTCCATCTGCGGT	30	K109T	GGCTTGATAAAATGCATAATAATCTGCGCT	30
K110	nhaB	K110S	CCCAGGAGATATGCATGATGGTTTCCCTTA	30	K110T	TAAGAATCAGAGATCTAATCGGGTGGCCG	30
K111	ycgO	K111S	CGACTCTGCATGCATGCCGATGCCAGAA	30	K111T	CTTTACCGAGAGATCTTTCTGGCTGGCGTT	30
K112	chuA	K112S	CTTGAGCATATGCAATTATGGTTATCCCTT	30	K112T	TCAATGGCAGAGATCTCCGTTTACAATCG	30
K114	narX	K114S	CGTTTATGCAATGTAACCTCTCTCTTCAGG	30	K114T	GCCAGAGATCTGGATAATCAGAAATCCGG	30
K116	hnr/rssB/sprE	K116S	GATCGAGATCTGTTCGGCTCGCTTGGCGGC	30	K116T	GGCTGATGCAATGTTCTCTCCCTGACTGGC	30
K117	yehE	K117S	CGCGAGAGATCTTGGAGATCTGCAGCAGC	30	K117T	GGTCTGATGCATGGTTAGCTCCGAAGCAAA	30
K122	topA	K122S	ATTCCTTGATGATCTAAAAAGTAGTCGCGCG	30	K122T	GACAAGAAGCTTTATGCATATTCACCTTACC	30
K132	sfcA	K132S	TTGAATATGCATCTCCCTGGGGGCTTTTATC	30	K132T	GGTTGAAGATCTTGATAACGACATCTCTAG	30
K135	yidA	K135S-1	ATGGGAATGGTATGCATTAGCGAAATATGA	30	K135T	CTCTGAAGGAAGATCTGGTTGTTGAAAGTA	30
K137	ydeA	K137S	GATTATGGAATGATCTGAGGTTACAGAT	30	K137T-1	CAGTGTTTGATGCATAACAGATTATCGGG	30
K138	ydeF	K138S	TAGTAAAAAAGATCTGTGCCCTGTAAACACA	30	K138T	TAGGGATAAATGATCTTGTTCTCCGGCAG	30
K139	yphM	K139S	TGATCTGGCGAGATCTTCGCCATAAGCG	28	K139T	GTTTGATGACGATGCATTTGAATCTCTGC	30
K140	312#0.1	K140S	ATTCAAACTGATGCATGGTTCACCTCCAGT	30	K140T	CTACATTTACAGATCTCTGTAACCTTACCA	30
K141	ehv	K141S	TCCAATAAATGATCATGTCTCTCTCTGTC	30	K141T	ATGGTCTACAAGATCTACACCGCGAGTACA	30
K143	rsaA	K143S	CCAGTAGATCTGTACCCGGAACGAGTTTCC	30	K143T	CATAACATGCATGGATAGATAAAAACCTC	30
K144	tus	K144S	AAACGAGTAGATCTTAGCGAACCAAGCTT	30	K144T	GAGATCGTAAACGATGATAAATTAACAC	30
K146	(ydeQ)	K146S	GGCATCAACAGATCTTCAAAACGACGATT	30	K146T	CTTTAATTCATGCATCTTATCTCCAC	30
K147	alyB	K147S	GGTGCCAGATCTGTGGTTATGCGACAGCG	30	K147T	CGCGTTTATGATGATAAAATCTCTGTTCT	30
K148	rut	K148S	GGCGATTTGCAAAAGATCTATCGATTTTAT	30	K148T	GTTGAAGCTTATCATGCACTGATTCCTTT	30
K149	ydhC	K149S	AGCATCCCGAGATCTCGGAAGCATAAC	28	K149T	TTTTCCCGAGGATGCATGATATCTCTAAA	30
K150	ydhE	K150S	CTTTAAACCAGATCTGGCGATTAITTTCTG	30	K150T	CTGATATACTTATGCATGTGAACACCTTT	30
K152	ydhM	K152S	CCCTCACTGGATCTCAATAATGTGACACA	28	K152T	GGAAATAGGGATGATGATAGGTTCTACTT	30
K153	ydhN	K153S	ACCGTCTGCGTGGATCCCAATTTATGT	29	K153T	GCCTTATTTTGATGCATTTTACAGCTCCT	30
K155	himA	K155S	TTTTGTAAGATGCATAGGTTCAATCCCTCA	30	K155T	CATTGCTCAAGATCTGATGTTAGCCCGGTG	30
K158	seiD	K158S	CGAGTTCTCATGCATGGACATCTCTGTCA	30	K158T	ACGGGTGAAGATCTCGCAAAACATCTCGGT	30
K162	yoeE	K162S	TAAGAAATGCATGACAAGCTCTGCTTAAG	30	K162T	GGCTGGAGATCTTGAAACGGGCTGCCCTCCC	30
K163	335#10.1	K163S	AAACTATGCAATCTCCATCTCCGTTTACC	30	K163T	AGAGTAAAGATCTTGCGGAATATCAACAG	30
K164	icmA	K164S	ACTTCATCGGATCCCGCATGCCA	25	K164T	GGATTGATGCATCTGTTGGTGAATATA	30
K165	holE	K165S	CACGCTAAAGATCTAGTGTCTTTGCTTTT	30	K165T	CCAGATCTTATGCATCTTAACTCTCTCA	30
K166	336#13	K166S	GCTGAAAGATCTGCGTAAACTGGATCAAA	30	K166T	CTTTCCAGAAATGCATAATGACTTTCTTTT	30
K169	rusB	K169S	CGGTCTGCTTCATGCATCTTTACCTCAIA	30	K169T	CCTGTTTTTAAGATCTCCCTGAAGCGGGTC	30
K170	rusA	K170S	AGTCTGCCATGCATATGACGCTCTGCGTA	30	K170T	TTCTCCAAGAGATCTTAITTCACCCACCGG	30
K171	rusC	K171S	GAGAAATAATGATCATCGCGTCTCCGTTT	30	K171T	AAATGTGGCGGAGATCTCGGTACTGATGGT	30
K172	yehC	K172S	CTATGACCATGCAATAAAATATCTCAGAT	30	K172T	CCCGTTTATGATCTTAGTGGTCACTACGCA	30
K173	cheB	K173S	ATTTTATGCACTGTTAAATCTTACTTAGCG	30	K173T	CCGACTAGATCTTCGTTTGGGTTCCGTGGG	30
K178	uvrC	K178S	GGTCAAACTGATCATGCATGACTTGATA	30	K178T	GGCGAGGATCCGACGCAATCTGGAAAGATA	30
K179	uvrY	K179S	ACGTTATGCATAGGAATATCTCCAGAAATA	30	K179T	GCCCGAGATCTATACTGACGCTAGGCTGT	30
K181	dcm	K181S	ATAATTTTATGCATAGATTTCAACCGGCC	30	K181T	GGCGGCAGATGAGAATCTCGATATGCTGGT	30
K182	cypR	K182S	GCGTGCATGCAATAAAATGTAACTGCTGC	30	K182T	TACATGATCTGCATTAATGCCACGATAG	30
K184	yoeO	K184S	GATGTGCTATGCATCGATTCCTCTGTAGT	30	K184T	AATGACCCCGAGATCTCGGCTTCCCGT	28
K187	alkA	K187S	GTTCAAGGTATGCATCGCATCTCTTATTC	30	K187T	CCTGAGTAATCAGATCTGGCAGATGTGCTT	30
K188	yegM	K188S	CCCCGGAGATCTTGTAAGCGCTGG	25	K188T	CGCATCCAGTAATGCATAGGAACATGCTT	30
K189	bacS	K189S-2	GTGCTAGATCTGCTGCACGCCAGAAATAAC	30	K189T	CCAGAAATGCATGCGCGCTCTTTTTCGC	30
K190	bacR	K190S	TGGGCAGATCTGCGCAAGACTTCAACCCAGC	30	K190T	AACCTCATGCATCTCTCTCTGTAATATCC	30
K193	yohU	K193S	AAAATCATGCATACCGCAACCACTTCTC	30	K193T	CTGCAAGATCTCCAGACGCGCTGGAGAG	30
K194	yehV	K194S	ACGAAAGATCTGGCACCGCGGTAATGGGG	30	K194T	TAAAGATGCATGCTCAACCTTGCTCGCG	30
K196	yohG	K196S-1	TTTACGCCACATGCATATCCCGTGGGTT	27	K196T	AGCGCAACAAGATCTGAGACTGAAATATTC	30
K201	nfo	K201S	CGGAAACTTTCGAGATCTACATTGGTTCTA	30	K201T	GCCTCCAATGTAATGCATGCGAGGACTCC	30
K203	hcr	K203S	AGCGGCATATGCATGGCCAGCAGG	24	K203T-1	GCGCAGCAACAGGATCCACGTTACTTC	27
K204	narP	K204S	CGCGCCAGATCTCAGGTTGTACCAATGCTG	30	K204T	TGCTTCTATGCATAGATGTCCTGAGGTTT	30
K206	yofJ	K206S	TACAGAAGATGCATGCAAGAAACCGGAC	30	K206T	CAACTGTGGAGATCTGGGCTGGACGA	26
K207	altB	K207S	GGCAAAACAGATCATGCATTACCTCTCTCA	30	K207T	AGAGCGTGGACGAGATCTATTCTAAACGCGC	30
K208	ada	K208S	GTGGCTTTATGCAATAATCAGCTCCCTGGT	30	K208T	GGATTTATATGATGATCTCTCACCGCTCGG	30
K210	yohN	K210S	CATACAGATCTACCTCATTAATCAGTGGG	30	K210T	TTCTGATGCATTCGTTTATGACCTGTTA	30
K211	rcsB	K211S	CGGGAAGATCTTGGTACACGCTACTCTGTG	30	K211T	ATATTATGCATGTAATAGGCTACCTTGCTA	30
K212	rcsC	K212S	TGCTTATGCATGTAGCGAGGCGCTTTCAG	30	K212T	CCGAGGAGATCTCCATACGCTCAATGGGG	30
K213	atoS	K213S	GCATTTAGATCTTATGATGCGTTCATGC	30	K213T	ATAATAATGCATGCTGAAATCCTAGTCTT	30
K214	atoD	K214S	TGGTCAATGCAGATCTATATCTGAGAGCTT	30	K214T	TCAATTTTGATGATTTTATATCCCTCTT	30
K215	gyrA	K215S	CGCAAGGTCAATGCATTAACCGGTATCCCT	30	K215T	CACCAAGTTGGCGACAAGATCTGACCACTGA	30
K224	dsdX	K224S	GCCACTTCAAGATCTGCATTTTGTATAAT	30	K224T	AGATTTGAGAATGCATATCTCACTTCCCC	30
K225	dsdA	K225S	TTATCTCTCAGATCTGCATATGCCACCCGA	30	K225T	TTTTAGCGTTATGCATAGTAGTCTCTTTG	30
K226	emrK	K226S	AATCTGATGCATTATATCTCTCATTTCTC	30	K226T	GCTGAACAGATCTTCGCGCTTCAGT	25
K227	evgA	K227S	GAGTGAATCTTGGCATCAGTTTATCCAG	30	K227T	TATTGATGCATAGATATTCCCTTGCAAA	30
K228	(yehU)	K228S	GTCAACCAAGATCTAGCGTGGCAGCATCAG	30	K228T	TATTTCATGCATGGGTGACTCTGAATAAGG	30
K233	lig	K233S	TTTCGTAATGATGCATATCGCACCATCAAT	30	K233T	AGTTTCGCCAGATCTGCGCCAGCGCCGCA	30
K236 (N)	entH	K236S	TTTCGTTAATATGCATGCTTTACTTCCCT	30	K236T	CCGACAGTCTAGATCTGGTGCCATGGGA	30
K237	yphE/entS	K237S	TAACAAAATATGCATGCGGTTTAAAAAGG	30	K237T	TGCCGATACAAGATCTAATGATGAACCGGA	30
K238	narQ	K238S	CACGGTAGATCTTCTGACGCGCGGTGGCG	30	K238T	TTAACATGCATACGCGTCTTCTCCACAAAA	30
K239	acrD	K239S	TCGACTGAGATCTGCCAACCTTGGC	25	K239T	AGAAATATGCATTAAGAGAGGACCTCGTG	30
K240	hyfA	K240S	TCCCACATGAGATCTAGGATGGAGTTAAG	30	K240T	AAACATGCAATGCATATGCAATAAGGAT	30
K241	perM	K241S	TCAACATTTATGCATAAAGACCTTCCCTTG	30	K241T	AATAGAACCTAGATCTCCGACCCAGGTCAG	30
K243 (N)	yphF	K243S	TCATTTTGTATGCATAGAGCTCTCTGTAG	30	K243T	GTCAGTTTATAGATCTCCAGTTATACGGG	30
K244	yfhA	K244S-2	GCAAAAATGCATGATACCAAGTTTGCTGTA	30	K244T-2	GGAACGAGATCTCCGTACTGTGACCACTC	30
K245	yfhK	K245S	CAGATAATGCATAGCCGGGAATACCGCG	30	K245T	TGGTGAGATCTCGCTATGTGATAACTTTG	30
K246	recO	K246S	GCGCGTGCAGCCATGCATCGGAGTTACT	30	K246T	GCGCGGATCAGGAGATCTACGTGATACA	30
K247	ung	K247S	CTTCAACGCGAAGATCTGGTTTCACTTCT	30	K247T	GTTAATTCGTTATGCATCTCGCTCTCTGCG	30
K249	recN	K249S	CGTTTTTGTGGTGAATCGCAAGTTGTTCAG	30	K249T	GGTTCAGTTGTGATGCATAGTCTGTTCTCT	30
K250	ygeE	K250S	CCGGAAAAACAGATCTTCCGCGCCACCAAC	30	K250T	TGTGACTCTTATGCATGATCAGCGGCTATT	30
K251	proW	K251S	CTACCCGGATAGATCTTCTGGCGGATGCGG	30	K251T	TATTTTGAATGCATATTAATCCCTTCA	30
K252	proX	K252S	TGCGCGCATAGATCTCTGGTCCGAGGCAAA	30	K252T	GTACCGCTATGCATGTTTATCTCTTTT	30
K253	emrR	K253S	GAGCTATGAAGATCTGCTGCTTGGG	25	K253T	TAAACGAACATGCATTTGGGTATGACCTC	30
K255	emrB	K255S	ACTAACTGGGAAGATCTGCCAGCCGTGCAA	30	K255T	TTTTGCTGATGCATCACGCGACCTCTGGA	30
K256	recA	K256S	TTGTTTTGCTGCTATGCAATTTTACTCCT	30	K256T	GCGCAACCGTAAGATCTGCGAGTCTGTG	30
K257	oriA	K257S	ATTTCCGCGGAGATCTCATACACTTGCAC	30	K257T	TAATGGTTTATGCATGTTTCTCTCTTCA	30
K258	oriD	K258S	GAGCCAAGATCTGGGTTCTGGTATGCTGGC	30	K258T	ACCTGATGCATTTTACTCTTAAACAGAT	30
K259	aseF	K259S	TGCGCAGCGGAGATCTAAGCACCATATCG	30	K259T	CATAATTTTATGCATCGGATTTATCTCTG	30

K260	<i>mutS</i>	K260S	GCATAATCTGTTAGATCTCTTCACGCTTTG	30	K260T	TCTTATGCATGCATGGGGTTATGTCGCGT	30
K262	<i>basA</i>	K262S	ATCTGCAGATCTTAGCGGTGCGGTATGGG	30	K262T	GTAGTTATGCATGGAGTTCCGTTATGGGAC	30
K266	<i>recD</i>	K266S	CTTTTGCAATGCATACGCCCTCTCCA	28	K266T	CGTCAACGGGGAAGATCTGCACAGTTT	28
K267	<i>recB</i>	K267S	GGCGACATCATGCATCTTTTCACTCAICA	30	K267T	ACCAGCTCAAGCTATAGATCTCTGTGGGG	30
K268	<i>recC</i>	K268S	GGTAGACCTTATGCATAGCGGCTCTGACT	30	K268T	CAGCTTCCCTGAAGATCTAACCAAGTTT	30
K277	<i>endA</i>	K277S	TGGCTGGAAAGATCTGAAATTCGCTCAAT	30	K277T	CAATAACGATGCATCACTTACCTCGGTGT	30
K278	<i>mutY</i>	K278S	GTTCCTTAAAGATCTTTCATGCGCAGAAGC	30	K278T	ATTGGACGCGATGCATGGTCACCGAATCA	30
K283	<i>ygiX</i>	K283S	TTTCGAGATCTGTAGTTGAGCAATTCAGGG	30	K283T	TAAAAATGCATTTTTTCTATCCTGGGATA	30
K284	<i>tolC</i>	K284S	GCAATCCGATCCGCTCAATCAGCAC	27	K284T	TTTCTCATATGCATCTCTGTGGTGAAGC	30
K286	<i>rpsU</i>	K286S	CGGAAATTCGGCGGGAGATCTTCCAGCAT	30	K286T	CGTACTTTAATACATGCATGTGCCTCTCA	30
K292	<i>yrbL</i>	K292S	TGGGCAAGATCTCCCGGCTGCAATGAAGC	30	K292T	ATAAGCGATGCATGCCATCTCTGGAAATA	30
K293	<i>arcB</i>	K293S	AATTTGATGCATTAGGGAATCTCTTCAGA	30	K293T	GTGTGAGATCTCGCCGGAGCTGCGTGGCGG	30
K297	<i>acrE</i>	K297S	GTTTCAATCAGATCTTGGCGGCTCTCAGA	30	K297T	GGCATGTTTATGCATTAATCTCTCAAAA	30
K305	<i>dam</i>	K305S	CGCGGATTTTATGCATGCTGACTAACTAA	30	K305T	ACCGGCTGCGAGATCTACGCCAGCACAAA	30
K306	<i>ompR</i>	K306S	GTTCATGCATTGTTGTACTCCCAAAGG	30	K306T	CAGCCAGATCTAGGAGTTAAGACTCTTCC	30
K310	<i>ugpA</i>	K310S	CGGACGGGATGAATGCATTACGGTTAATTC	30	K310T	CCACCGAGAAAGATCTATAACGGTGAATCG	30
K317	<i>yhiL</i>	K317S	TTACTCTTATGCAATAATCGACCGCATAA	30	K317T	AATGGTGAAGAGATCTCATAGGCGAAACG	30
K319	<i>yhiU</i>	K319S	GAAACTAAGATCTATGAGGACATCGTCAC	30	K319T	TCTTCTATGCATTTAGTCCCTGAAATTC	30
K320	<i>yhiB</i>	K320S	ACTATATGCATAACTGAATCTCCACCTGAA	30	K320T	TCATGAGATCTGGCTGTGAGTTTGACCCGTC	30
K327	<i>mutM</i>	K327S	CGGGATATTATGCATAGCATCTCCAGGAA	30	K327T	GGTACTGGTCAGATATACCACCTAGCAG	30
K328	<i>dinD</i>	K328S	ATTGCCGCTGAAGATCTCGCGGCGCTGGAT	30	K328T	GATGATGTTCAATGATTGCCCACTCAATGT	30
K329	<i>rpoZ</i>	K329S	GACACCCAGAGATCTGTTTACACACCA	28	K329T	CAGTTACCGCATGCATCTAATAAAAGCT	28
K333	<i>uhpT</i>	K333S	TTAAGAAAGCATGCATGGGTACTCTGAA	30	K333T	ACCCGCGGAAGATCTGCATCTCACTTCT	30
K334	<i>uhpA</i>	K334S	AACGGTATGCATGCTTGTCTCGCGGGT	30	K334T	ATGATAGATCTTCAGGAGATGGGACCCGCC	30
K335	<i>enuD</i>	K335S	AACCTTCTAATGATCTGTAGCAATGTG	30	K335T	GCCTTTTCATATGCATGATGCTTTTATAA	30
K337	<i>dgoT</i>	K337S	GTGCTGATTAAGATCTGGAGCCGTATCGC	30	K337T	CGAAGCCGCTATGATGACCTGTAAATTAC	30
K338	<i>gypB</i>	K338S	CATAAGAAATATGCATCAACGTTTCTCGCT	30	K338T	CACCGCTGGAGAGATCTCAAGCGATGCT	30
K339	<i>recF</i>	K339S	CAGACGGGTGAGATGCATTACAGTCTATT	30	K339T	GACCGGTACAGATCTCGAGATGGAATGGT	30
K340	<i>dnaN</i>	K340S	CTACGGTAAATGCATAGGTTTACGATGAC	30	K340T	TAAAGAAAGATCTCAGGAAGAGTTTTCGA	30
K341	<i>dnaA</i>	K341S	AAAGCGAAAGATGCATCGCGGACTCCACTC	30	K341T	GGCTTTATGGGGATCCCGGAAATATGAA	30
K343	<i>yidY</i>	K343S	TTAAGGCGAAGATCTCTCAGGCGGCA	29	K343T	CAAAAAGCGATGCATGGGCTAAAGCGTCT	30
K344	<i>ptsB</i>	K344S	CATTGTGGTGGCGAGATCTAGCACTTCTC	30	K344T	GTTTCAACATATGCATTGCAATCTTTTCC	30
K345	<i>ptsS</i>	K345S	GGTGATGCACGATCTTCTACACCGTTCC	30	K345T	GGTACGCATAACATGCATAATGTCTCTCGG	30
K349	<i>yieO</i>	K349S	GCCTCTTTTATCATGCATTCAATGTCCTG	30	K349T	CGGTGAGATAGATCTGGCGGAGCAAT	26
K351	<i>yjgB</i>	K351S	CTTGAGAAACAGATCTTGTGCTGTATTC	30	K351T	GTCCACATTATATGCATAAGATCTCGCTG	30
K354	<i>uvrD</i>	K354S	CGCCGGCTGGGATCGGAAGAAGCCAGTGC	30	K354T	GGTAAAGAACATGCATTGGCACCGCGCGT	30
K357	<i>551H4</i>	K357S	CACCATTCTAAGATGCATGATCACTCCCGG	30	K357T	CGCCGACGCGAGATCTCTCATCGATAGCG	30
K359	<i>psdA</i>	K359S	CAAAAACGCGGATCTTTTGCCAAATGACT	30	K359T	GGGGGATCTGATGCATAATGTCCTGCTG	30
K360	<i>ntvB</i>	K360S	TGCTGTATGCATAAAGCAGTCTCTGAAC	30	K360T	GTTTCCAGATCTGGCAGCTAACCCGTACC	30
K361	<i>yihQ</i>	K361S	CACTGTTGATGAAGATCTGTTCCAGTTC	30	K361T	GTGGACGTGGCGTATGCATAACTAATCTC	30
K362	<i>frsA</i>	K362S	CCCATCTGGCCAGATCTGGAAGCAGTGTG	30	K362T	CGTTGCAGTAAAGCATGCATTAATCGCAC	30
K363	<i>rhaT</i>	K363S	CAGTTTGGTGTATGCATCTTCAACCGCAG	30	K363T	CGTAATCGGTTATGCATCTTCTTATCTCT	30
K365	<i>cpaR</i>	K365S	ATTTTATGCATTGTTTAAATACCTCCGAGG	30	K365T	CCCCAGATCTTGGGGAGACAGAGGATGG	30
K369	<i>prfA</i>	K369S	GTGGGCAACATGCATAGCATCATCTGACT	30	K369T	GGGATGTTGAAGATCTTGTGAAGCGGTCA	30
K370	<i>ptsA</i>	K370S	CTGCACATCCGCTATGCATGGTCCGGCGC	30	K370T	GTATTTTCAAGATCTGCACCAACTCATTC	30
K372	<i>hemE</i>	K372S	CAGGTACATAGATCTGATGTGGGCTGTTT	30	K372T	TTTTAAGTTCATGCATTGTGGTGTCTCT	30
K373	<i>hydH</i>	K373S	TGGCAAGATCTGATTCTGTGCTGGCAAC	30	K373T	CATAAAATGCATCTTCTTCTTGCTGCTC	30
K374	<i>ygiE</i>	K374S	CGAAACCATGCACAGATCTCTGGAAGAAGC	30	K374T	GAATTATACTGGGTATGCATTACAGCTCG	30
K375	<i>malF</i>	K375S	CTTCTCTGGTAGATCTGATTAACAAACAA	30	K375T	CTTTTATATGACATGCATGGGTTCTTCTCT	30
K379	<i>lexA</i>	K379S	GAATTATCAGATCTGCTGGCTATCTCGGA	30	K379T	GTAAACGATGCATCTCCGCCCTGGGGTGT	30
K380	<i>dnaB</i>	K380S	CTTTAGCGAGATCTGGCGTTTTTGCGCGG	30	K380T	GTTTATTTCCATGCATAGTGAATGGAGTTA	30
K381	<i>uvrA</i>	K381S	CTTCGATCTTATGCATCACTTTCCCGGTA	30	K381T	GTTCACCCAGAGATCTGTGGTGTAGCGACT	30
K382	<i>ssb</i>	K382S	GCACGTTATCCAAGATCTGGGTGACGGTTT	30	K382T	ACGCTCTGCTATGCATGTTCTGTCTCTCT	30
K385	<i>yjcP</i>	K385S	GTGACGATTATGCATGCTGGCTGCTCTTG	30	K385T	AAGTAATGCAGATCTCACGCCAGCAGGAAG	30
K387	<i>rpsJ</i>	K387S	GCAAACTGTTTCGAGATCTGGAATACCG	30	K387T	CTCTGACTGATGCATCACTGTTCTGTGTC	30
K389	<i>basR</i>	K389S	AGAAATGCATCTACTCACTCTCTGCAAG	30	K389T	AGCGGAGATCTATATCATCAAGCAGCGGG	30
K391	<i>dcaB</i>	K391S	CTTGTGCCAGATCTAATATAATATCCCTC	30	K391T	GGATAGTAAATGCATGTGTGAACCTCCG	30
K392	<i>dcaS</i>	K392S	GAATGATGCATCAAGCTTCTTGTGTGACAA	30	K392T	CCCATAGATCTCGAATATCATCATACCTCC	30
K395	<i>ecbB</i>	K395S	CTGACCGCTAAGATCTTAGAAAACACTTTC	30	K395T	GTCTTCTTATGCATAAGCTTCTCTTTTAG	30
K396	<i>sugE</i>	K396S	CGAACTCTGTAGATCTGGAATCGTTGATC	30	K396T	AAAAACAAATGCATGACACAGCTGCTAC	30
K397	<i>yjcF</i>	K397S	AACGGTTCGAGATCTTCCGGGATCGCCCTC	30	K397T	GTATGTTCAATGCATGTCAGGCCCTCGAT	30
K398	<i>mutL</i>	K398S	GATTACTAGATCTCGGTGATGGGCGCAGT	30	K398T	AGACCTGAATATGCATCAATCGTCTTATG	30
K399	<i>uidB</i>	K399S	TGAAGTAATAAGATCTAATGCCGCTGCTTT	30	K399T	TGTGTCTCCATGCATCAATGGCAGTACCA	30
K400	<i>rpsF</i>	K400S	GGCGCTTGCGAGATCTGTTCTTCAATTAAT	30	K400T	GATTTCTGAATGATGCATGAAATGTGCTCT	30
K405	<i>treB</i>	K405S	CACGAAGCCTACCTGGAGATCTGCAAAAGC	30	K405T	GTTTATTTGCTATGCATAAAGCCCATGG	30
K406	<i>mgdA</i>	K406S	GCCAGTAGATCTGAACAGCATACGCGCTG	30	K406T	TCTTTATGCATAAGGATCCCTCCGACTCG	30
K407	<i>idnD</i>	K407S	CACATACTCTGTAGATCTGCTTGTGGACG	30	K407T	GTGTTTTCATGCATGATAATCTCTCACTGG	30
K408	<i>fecA</i>	K408S	GCACGCTGTGGAAGATCTTCTCGCCAGTGC	30	K408T	GCGTAAACGATGCATCACTTCCCCATCATC	30
K410	<i>yjiO</i>	K410S	GTAAAAAACGATGCATAACAAACACTCC	30	K410T	ATCATGCGGAGATCTGGTGGTGAAGTTGT	30
K411	<i>mcrC</i>	K411S	TTTGTGTAGCATTTCTGTTGTTTATAGGG	30	K411T	CAGTTCCATAGATCTTATAGCTATGAGAT	30
K412	<i>mcrB</i>	K412S	GATATGCTCTTATGCATGCTAAGCCTCTAT	30	K412T	GACTGCACAGAGATCTATTGCACAACTGTT	30
K413	<i>hdsS</i>	K413S	CAATTTCCCGCATGCATCTTCAACCCCA	30	K413T	GATGGATAAGTGAATCTGCACACCAATCT	30
K414	<i>hsdM</i>	K414S	ATCGTTAATGCATTTGTGAGTTCCGTAAA	30	K414T-2	AAAGCATGGAAGAGATCTGCAATGAAGAT	30
K415	<i>hsdR</i>	K415S	AAGGCCAATGCATCTCATCTTACGTTTCT	30	K415T	CCGAGATCACGAAGATCTTTTAGCGCTGAT	30
K416	<i>dnaT</i>	K416S	CTTGGAAATGCATCTGTTTCTCAAAA	27	K416T	AACCTTTATGAGATCTATGCTGGTCCG	27
K417	<i>flaH</i>	K417S	CGCGCTAGCTTCAGATCTTAGTGTCTTAC	30	K417T	GTGCGGAACGATAATGCATAATCGGATAG	30
K420	<i>creB</i>	K420S	GCACAGATCTCAGGTAATGGATAATAGC	30	K420T	TCCCGATGCATAAATCGCTCTGTTATGCG	30
K421	<i>arcA</i>	K421S	CGGGGTATGCATTTTGTCTACCTAAATGCG	30	K421T	CCATCGAGATCTTTTCCCGCGCGCTGCGC	30
K423	<i>cusS</i>	K423S	GCTTACTATGCATCCGGCACCTCAAGCATG	30	K423T	CCGGAGAGATCTTGACCAAAGGGTTAACCG	30
K424	<i>cibB</i>	K424S	TCAGGTGAAGATCTCGTGGGGCCATTATC	30	K424T	AATGGAGCATGCATTAGGTTTCACTTTCGG	30
K425	<i>hdpE</i>	K425S	CAAGACATGCATCCGTCGCGCTCCAGCG	30	K425T	TCAGGCAGAGATCTTAACGCTCGATCTGGC	30
K426	<i>phoQ</i>	K426S	GTAATTTATGCATCAGCGCAATCGAACAG	30	K426T	GTTGTTGAAGATCTTGCCTTGTACGTCTC	30
K427	<i>narL</i>	K427S	CTGATTTATGCATGGGTATCTCTTGGACG	30	K427T	CGTAAACGAAGATCTGCATCTGGGCGCAG	30
K428	<i>cheY</i>	K428S	CTTTATCATGCATTTCACACTCTGAFTTA	30	K428T	GTACGGCAGATCTGGCGAGCTTTGACAGCA	30
K429	<i>yedV</i>	K429S	TAGTCTATGCATTAATTTTTTACCGCTACG	30	K429T	GCTGGCAGATCTTACAAACGTTAAGAACAG	30
K430	<i>yebT</i>	K430S	CTGCTCCATGCATGGTAGTGTGAACGTTAT	30	K430T	CGCGCGCAGATCTTTGCGGGGCAATGAGC	30
K431	<i>evgS</i>	K431S	CTTAGCAGATCTGACTGAAGCGGAAGTGC	30	K431T	GTAAAAATGCATGTGGTTAGCCGATTTTG	30
K432	<i>h238I</i>	K432S	CTGTGCGAGATCTTCTCCACGCAACTGGAG	30	K432T	ATGATGACATGCATAATATCACTCCCGCTC	30
K433	<i>ygiY</i>	K433S	GATAGAAGATCTCATGCTGATTTGGCGACGG	30	K433T	GGGTAAATGCATTTCTCACTAATGTGTA	30
K434	<i>enuZ</i>	K434S	GCAATCGATGCATGCTTTAGAGCGCTCCGG	30	K434T	TGCAAGAGATCTACAAGATCTGGTGGTCG	30
K435	<i>uhpB</i>	K435S	CAACGTATGCATACCCAGCCATCAACATG	30	K435T	TATAGAAGATCTCTCATCGTCCGCTCCGG	30
K436	<i>ntvC</i>	K436S	CCCTCGATGCATAAACGTCACCTTTATTTTC	30	K436T	GTACGGAAGATCTACAGCACGCCAGCAGG	30
K437	<i>cpvA</i>	K437S	GCTGCCATGCATGAAGCAGAAACCATCAGA	30	K437T	ATGACCGAGATCTGACTTCCCTATTAAGGG	30
K438	<i>hysG</i>	K438S	CGCTGGGAGATCTTTCGGCGAGCGTTGCC	30	K438T	ATCTGTATGCATCTTGTGGGCTCTTACGC	30

K439	<i>busS</i>	K439S	CAGAAAATGCATCAGATTCAATTAGTTTTC	30	K439T	GGGACTAGATCTGGCGGCCAAACCGAAGG	30
K440	<i>deuR/yjgG</i>	K440S	TACATTATGCTCTGTTGACCTCTCCCGG	30	K440T	GACTCGAAGATCTGGTCAACTATGCTGACG	30
K441	<i>creC</i>	K441S	GGGAAAAGATCTGGTTAGTGAAGATGAGC	30	K441T	ATCGCGATATGCATTACAGGCCCTCAGGC	30
K442	<i>yacH</i>	K442S	GCAAAGTCAATGCATAATTCCGGATCTCAA	30	K442T	CGGTTGGTTAACAGATCTAACAGGAATTC	30
K443	<i>yqeA</i>	K443S	ATAACGCTTATGCATAGCAACGCAACATC	30	K443T	GCACCAICTTAGATCTTAAATTTCTCTCA	30
K444	<i>sobA</i>	K444S	CGCAGTGAACAGATCTGTCCGCAACCGCT	30	K444T	GAGCATAGCATGCATGATCTACTGTCTCT	30
K445	<i>rpsJ</i>	K445S	TTCTTTGGTTATGCATGAGACCAAGCTCC	30	K445T	CTACTTATATAGATCTGAAGCAAATATTC	30
K446	<i>mucC/pasZ</i>	K446S	TGGCTAACTGATGCATCGCTACTCTCCAGA	30	K446T	ATACGGGCCAAGATCTGTGGCGCATACCG	30
K447	<i>yeeE</i>	K447S	ATATCATGAATGCATAAATTAATTAACCA	30	K447T	GTCACAGCTAGATCTATCGTGTACGTGC	30
K448	<i>yfgD</i>	K448S	CAGCACCAGAAGATCTGCTATGGTCAGCAA	30	K448T	TCAACTGCTTATGCATAACCTCTATCCTGT	30
K449	<i>yhhP</i>	K449S	AAAAAGAGATCATGCATTTTCTCTCATCAC	30	K449T	TACGCCAGAAAGATCTGAAGAAAAGGCCA	30
K450	<i>h1017</i>	K450S	GCCGATGAGATCTATCATCGCTCCGCCG	30	K450T	CACACAATGATCGGCTCGCTGGGTACGC	30
K451	<i>cutC</i>	K451S	CCATTGATGCATATGCACATCCCGTCAA	30	K451T	CGCGGGTTAGATCTGTGGCGAGCTTTTG	30
K452	<i>dsbC</i>	K452S	TAAACCTTTATGCATAAAATCTCCCGTTC	30	K452T	CGCGAAAAGAGATCTTTTGAGGCATTACTG	30
K453	<i>xerD</i>	K453S	CCAGATCTTGATGCATTTGGCGCCCTTATG	30	K453T	GGGATTTACGAGATCTTTGTGTCAACAAG	30
K454	<i>exsC</i>	K454S	GCATCAGCCAATGCATCCCGTGCAATTT	30	K454T	GTTATTACAAGATCTGGATCAACCACTGT	30
K455	<i>flpA</i>	K455S	AACAGTGAATGCATCAATCTCCAGGATC	30	K455T	GTAACCAATGAGATCTGGTCAGAACTGTA	30
K456	<i>rfaD</i>	K456S	CACTAAGCAGATCTTGATAGCTTTATTAC	30	K456T	CGGTAAAGATATGCATAACTGTAACTCTG	30
K457	<i>lpsD</i>	K457S	GATGTCCCAAGATCTCCGTTGGTGTCTC	30	K457T	GTCGAATTGATGCATTACTTATTTAACT	30
K458	<i>nlpB</i>	K458S	GAAACAGAGTAATGCATCAAATCTCCTTAA	30	K458T	GATGATGACGAGATCTCTGGCTGATGGCG	30
K459	<i>rseA</i>	K459S	GTGTGTTCTTATGCATGCCAATAACCTT	30	K459T	CTTTACAAAGATCTGCACACTTAAACCTTT	30
K460	<i>rseB</i>	K460S	CAAAAGTTGATGCATTACTGCGATTGCGTTC	30	K460T	GATAACAAAAGATCTCCGCTTATCAAGGCT	30
K461	<i>rseC</i>	K461S	CCACTCTTTATGCATTCGCTGCCCGCAAC	30	K461T	GCCGGGAAGAGATCTAGCGCGCAATGAAA	30
K462	<i>surA</i>	K462S	TTTTCCAGTTATGCATACTTTTCTCATTC	30	K462T	CGCATATATAGATCTGCTGCGGTGGAAGT	30
K463	<i>yaeL</i>	K463S	GTTCGACGAGATCTGGTTGGCGGTATT	30	K463T	GAGAAAACTATGCATATACCTTCCGTTAA	30
K464	<i>yfiO</i>	K464S	GTGGCGACTGAGATCTTCGTCCACCGTGCC	30	K464T	ATTTCAATGCGATGCATGACGTTTGACTT	30
K465	<i>yggN</i>	K465S	GCATTTTGGCATGCATAGTCTTCCCTCAAG	30	K465T	GGGGGGCGTAAGATCTATGGCGACCGACTG	30
K466	<i>yiaQ</i>	K466S	CCGAAGATGATCTATGCTCCGTGACGGCG	30	K466T	AAAATAACATATGCATTACGTGCGACTGTG	30
K467	<i>yraM</i>	K467S	TTACCCACGAGATCTCTGCCAACGGGCG	30	K467T	GTTGAGGGATGCATAATGATCAAGTGATA	30
K468	<i>yfiJ</i>	K468S	CTTGCGTAGATGCATGGTGTTCCTCTT	30	K468T	TAACACCGAGATCTCCAGCTGCTGGTGAC	30
K469	<i>yzcN</i>	K469S	GAACTGTGACAGATCTATGTGACGCCAAAC	30	K469T	CTTTTTCATATGCATCGTTATATGCGTTC	30
K470	<i>atoC</i>	K470S	AACCCAGATCTGCATGCGCGAAGCAGAAAG	30	K470T	ATAGCATGCATACAGTCTGATTTCCCTCGG	30
K472	<i>htrA</i>	K472S	TGGTTGAAAAAGATCTGGAAAATCACGCT	30	K472T	ATGTGGTTTATGATCATGATTATTCAGTCTG	30
K473	<i>fabZ</i>	K473S	GTTTGCTTCGAGATCTAAACAGCAAAATC	30	K473T	GAGTGTGATGATGCATGATACCTCTCTGCT	30
K474	<i>mdoG</i>	K474S	ATAAATTCGAGATCTTCAGTAGGGGGATG	30	K474T	AACGCAATTTATGCATTTGATGTTTATGTT	30
K475	<i>dapA</i>	K475S	TACTTCCGTAATGCATGGGCCATCTCTGT	30	K475T	ACTTAACTCCAGATCTTTCATCATGTGGG	30
K476(N)	<i>cdsA</i>	K476S	TTGCGGCCAAAGATCTTATTGAGGCGTTAA	30	K476T	CCCCGCTGCATGCATGCGAGAACACAGCG	30
K477(N)	<i>ygiF</i>	K477S	CGATTTCTTGATGCATGGCCTTACTTATC	30	K477T	TGGCGGCATCAGATCTTTTCTTGGCGAAGA	30
K478	<i>yriP</i>	K478S	TGGGAGTTTAGATCTGTGGATTGCCGGTT	30	K478T	CGGATAATGCATGCATGATATCTCTTAAAT	30
K479	<i>427B1</i>	K479S	TGTATTCAGATGCATAGATGCTCAGCAGA	30	K479T	CAACATATATAGATCTTTTATATTTATTC	30
K480	<i>acpP</i>	K480S	TTGGTGAAGTAGATCTCTTGCTCAATAAG	30	K480T	CTTCGATAGTATGCATACCTTAAATTTCC	30
K481	<i>argA</i>	K481S	TTGTAATCTAGATCTGCGCCAGCAGCGGG	30	K481T	TACGTCTCTATGCATGGCACACCTCTTTG	30
K482	<i>araK</i>	K482S	GCTGCCCTTGCGATGCATGCTTGGCGATAA	30	K482T	ACGCTTGCTGAGATCTGAGCTTTCCGCGCT	30
K483	<i>cshU</i>	K483S	TCACCAAAATATGCATACGACTCCTGATT	30	K483T	CCAGCATCCGAGATCTGTGGAGACCCAT	30
K484	<i>desC</i>	K484S	CAGGOTTCAGATCTTAAACGCCAGAAAGC	30	K484T	CTTTCAGATCATGCAATTTCACTCTCCGCG	30
K485	<i>dsbA</i>	K485S	GAATCATCAGAGATCTTATTCGCTGTTTT	30	K485T	GCCAAATCTTATGCATGATCACTTACTCTCC	30
K486	<i>edu</i>	K486S	TTTTCCAGTTATGCATCAGAGTTTCTCTC	30	K486T	TGTTCTGTTAGATCTTGAACCATGGCTGA	30
K487	<i>flgB</i>	K487S	TGTTACGCGAGATCTTCTCGGTTGGCGC	30	K487T	CGAGCTTATCATGCATATCTCCCGCAGG	30
K488	<i>flgD</i>	K488S	CGCGATATCAGATCTCTCCAGTGAATCTAA	30	K488T	TTACCGCAATATGCATAGCTTTCTCTTTA	30
K489	<i>flgH</i>	K489S	GTTTGAAGATAGATCTTATCAAAACCATCG	30	K489T	CAGCGCTTTTATGCATGGCTATCATCTTCA	30
K490	<i>flhA</i>	K490S	CGGCCAGATATGCATGGGTCGGTTCTCG	30	K490T	CGCGAGTTGAGATCTGCAATTTTGAAAAC	30
K491	<i>flhI</i>	K491S	ACAGCAGCAGAGATCTACGCCCGCCGACA	30	K491T	TCGCGTAATCATGCATGTGTGCGGCTCTC	30
K492	<i>flhM</i>	K492S	AGCAGGCCGAGATCTGCAACAGCAAAAGC	30	K492T	GAATATCATATGCATGTCTGTTATCGCAGA	30
K493	<i>flhO</i>	K493S	GCAGCACTCAAGATCTGAGCTGGTCCGCAA	30	K493T	TGATGCGGCCATGCATCTGCAGCATGGCG	30
K494	<i>flsJ</i>	K494S	GCTTCTTACATGCATTTAACTTTCCCATG	30	K494T	AGCTGAATTTAGATCTAACTGATTTCTGT	30
K495	<i>gcvT</i>	K495S	GAGTCTGTTGATGCATCTTGTCTTCATGTA	30	K495T	TGATGCCGAAGATCTACGGTTGCATCGTC	30
K496	<i>gshK</i>	K496S	AGTCAAATCATGCATTTATTTGCCCCCAT	30	K496T	ATTTTTCATGCATCTCCCCGTTCGCCAAC	30
K497	<i>hslU</i>	K497S	GGGTCAATTCATGCATGGGAGATCCTTACG	30	K497T	GGCAAGAGAGAGATCTACAGCCACTCTCAAT	30
K498	<i>hslV</i>	K498S	TTACTATAGTATGCATGAGCTGACCCCTTG	30	K498T	CAACTGACACAGATCTAACCTGAGCTTCT	30
K499	<i>indB</i>	K499S	AGCGATATAGATCTATCCCATTCGT	30	K499T	GGACAAGCAGATGCATACCGCCACCATCAT	30
K500	<i>lesS</i>	K500S	GGTATGTCTCATGCATGCGAGCGAGTGTC	30	K500T	TACGGCTCAAAGATCTGTCTTGAACATGG	30
K501	<i>manX</i>	K501S	CCGGGAAGGAGATCTCCATGACGTTAAAT	30	K501T	CAATAGCAATGCATATGCTACTCTCTTT	30
K502	<i>minC</i>	K502S	TTGGCGTGTATGCATCTGGCTTACTCA	30	K502T	TTTTACGCGAGATCTCGCCGAGATATTTC	30
K503	<i>mobA</i>	K503S	TGCTCATCAGATGCATGATTCGCTCTTT	30	K503T	TCCCTGATGAGATCTAAAGTCTGACGGTT	30
K504	<i>motA</i>	K504S	CTAATAAGATATGCATGACATCATCTTCC	30	K504T	AGGGCCTGATAGATCTTGAAGAAAGCATTG	30
K505	<i>nviM</i>	K505S	ATGGCGCATAGATCTCTACGGCGAATAAC	30	K505T	TACGTAATTTATGCATTTTAACTCCCGACA	30
K506	<i>ompF</i>	K506S	TATGCGCTTATGCATATTTATTAACCTC	30	K506T	CCGCATTCAGAGATCTGCTGTGTTTGAA	30
K507	<i>ppc</i>	K507S	AATATGTTTATGCATATTAACCCAGACAC	30	K507T	TGTTGGGGCAGATCTAATTAATCAGGCTC	30
K508	<i>ppiA</i>	K508S	GGGTGATTTATGCATGAGATTTCTCTAAC	30	K508T	GGGAAAAACAAGATCTCCACTGGAAGAAG	30
K509	<i>ppiD</i>	K509S	TGCAAAATGAAGATCTTGGTATGAGGTTG	30	K509T	GTAAGCTGTATGCATGGTGTAAACAACACT	30
K510	<i>psd</i>	K510S	TAAATGAATTATGCATGGTAGCTCCAGGC	30	K510T	TGGTGGCTGAGATCTTTCGACATGAGC	30
K511	<i>ptl</i>	K511S	TCTCTTCACTAGATCTGAATTGCAACAGTA	30	K511T	AAATGCGCTGAATGCATAACCTTACTTACT	30
K513	<i>purK</i>	K513S	CGCAAACTGTATGCATACGCGACCTCGCG	30	K513T	GCTTTTCCGAGATCTTGGGTGCTTGCCAT	30
K514	<i>purL</i>	K514S	CGAGAATTTATGCATAAGTCTCTGTCTT	30	K514T	GGTGAGTTGCGATCTGTGAGTGTGGCCAG	30
K515	<i>purR</i>	K515S	CCATTACGCCAGATCTATAGGCACTGATTA	30	K515T	CTTTTATGTATGCATTCATTTCACTCCA	30
K516	<i>rcaA</i>	K516S	TAATATGCCAGATCTGCGCTATCATGGA	30	K516T	TAATAATCGTATGCATGGCATACCTCACT	30
K517	<i>rpsP</i>	K517S	AACGAATAGTATGCATAAACATCTCTTGTG	30	K517T	GACGTACTGTAGATCTTGAAGATATCGAA	30
K518	<i>slt</i>	K518S	CAGCAGCAGGAGATCTAACGCTACGCGACG	30	K518T	CTAAGTGTAATGCATCAATGCGAGGCTCT	30
K519	<i>smgA</i>	K519S	CAAAAGTGGCAAGATCTGGTGAATTGTCCCG	30	K519T	CAAAATGGATCATGCATGCGGGTGTACCCA	30
K520	<i>spy</i>	K520S	CAGTTAATTATGCATATCTATATCTTCT	30	K520T	ACCCATTTCAAGATCTGACATTTTGGCGCG	30
K521	<i>sspA</i>	K521S	TGGCAGCGACATGCATGAAAACCTCCAGGT	30	K521T	CAACGGTAAAGATCTATCAACCAACGTTT	30
K522	<i>tap</i>	K522S	GAATACGATTATGCATCAACGCTCCCATC	30	K522T	CCTCCGACACAGATCTGCACGGCGGCAAG	30
K523	<i>tig</i>	K523S-2	CGGGTGAAAGAGATCTGAATCGTCAICGAA	30	K523T	CAACTGAAACATGCATCTTGTATCTCAAA	30
K524	<i>tsr</i>	K524S	CAICTGGCGAGATCTACCGACCCACAG	30	K524T	TGATACGTTTATGCATGGTTCTCTTCTCT	30
K525	<i>ndk</i>	K525S	GGCGACGAAGATGCATACGCGGCAATATA	30	K525T	ATGTTCTCCGAGATCTAGCAGGACAACAG	30
K526	<i>uraR</i>	K526S	CCCGGCTTATAGATCTGCGGCTTTGGCCT	30	K526T	AGGTGGCAGAAATGCATGGTGTGTGTGCGT	30
K527	<i>ybaJ</i>	K527S	GTGAGTATTCATGCATAACGCGTCCCTTC	30	K527T	GGTGTGGTTAGATCTGCGAAGACGAGTA	30
K528	<i>yefJ</i>	K528S	TTATATATATGCATTTCAATGTTCTTCA	30	K528T	ATACGGGCTGAGATCTAAATAAACATTA	30
K529	<i>yfiA</i>	K529S	CTTAACCGGAAGATCTCGAATATCGATTAT	30	K529T	TAAATGTTCAATGCATAAAATTTCACTTCA	30
K530	<i>yfiD</i>	K530S	GGATACCTGTATGCATGTATGCTCTCCCG	30	K530T	TGGCGTGGGAAGATCTCTGACTGCGGGTA	30
K531	<i>yfiJ</i>	K531S	GGCGTTCGGCGAGATCTTATTTGGTGAAGC	30	K531T	TGCGGACAGTATGCATGAAGAGTTCTTACA	30
K532	<i>yhlG</i>	K532S-2	TTGCAAGGCCAGATCTTGAACGTGGACCGGT	30	K532T	ATTGTCCGATATGCATGAGTTAAGAAATGA	30
K533	<i>yhlJ</i>	K533S	GCGGATGCCAGATCTTAGCGCGCGAGCT	30	K533T	CTGTCTCATATGCATCTCCCTTTGTGACAC	30
K534	<i>yhiP</i>	K534S	AATACCGGTAGATCTAATCAGCTGACCA	30	K534T	GATTGCTGTTATGCATGATTGGCTGCGTT	30

K535	<i>yhiE</i>	K535S	TCCAATCTCGAGATCTAATCTGCTTTTCTTC	30	K535T	TGGCTGTTCATGCATAAATCTTTCTTATT	30
K536	<i>yhiW</i>	K536S	AAACAGGTGAATGACTCTGCTTAGTGGCT	30	K536T	GCCAACTCTTAGATCTGTCTGGTCTGGGT	30
K537	<i>yhiE</i>	K537S	GCACGGGCAAGATCTAACCACTACCAAGC	30	K537T	AAGCCTCTGTATGCATCCCATCCGGAA	30
K538	<i>yjiN</i>	K538S	TTTTTCGTTTATGCATATGTTGACGGGCAT	30	K538T	CGGTAACGGGAGATCTTTTGCCCGACAGG	30
K539	<i>yjiP</i>	K539S	GGCGCTCGCAAGATCTGTCACTAATGCGAG	30	K539T	ATTCTATTTCATGCATCTGTCTCTCTTTT	30
K540	<i>yjiY</i>	K540S	TATGTAACCAATGCATGATGTAATTAATAG	30	K540T	GCTCTGACGAGATCTCGCGCAACGCTTC	30
K542	<i>(gapC)</i>	K542S	CCTCTTCGGCATGCAATTTTTTCCGAGAAT	30	K542T	AGAGGCTAAAGATCTCCGTGGGAAAGCGAA	30
K543	<i>(mfjC)</i>	K543S	ACCCTATCCAATGCATCTCCCTGAAATTTC	30	K543T	ATTCGCCACGAGATCTCGGCTGGGCGCTG	30
K544	<i>aceE</i>	K544S	CGCAGCAGTCAGATCTCTCGACGCGGAAT	30	K544T	GGAAACGTTTCATGCATGGGTATTCCTTAT	30
K545	<i>aceF</i>	K545S	AGGTAGCAAAAGATCTGTTACGCTGCTCGG	30	K545T	TGATTTGCATATGCATTAATCTTTTACCTC	30
K546	<i>ackA</i>	K546S	CAGAGATGAAAGATCTCGATCGGCGGATA	30	K546T	CTAACTTAATGCATGGAAGTACACTATAA	30
K547	<i>ace2/aceB</i>	K547S	CGTAACCGCGAGATCTTCAGACACAGCCAG	30	K547T	GGTATTCTTCATGCATGACGGTTCTCTCTG	30
K548	<i>adi</i>	K548S	TTAATATCTTATGCATGTCTTACCCGGTTA	30	K548T	CTGGGCTTTAAGATCTAAAACTATGATCAG	30
K549	<i>agal</i>	K549S	GGCCTCAAGAGATCTGTTGGGCCAATC	30	K549T	CAGTGCTCTGATGCATTACAAAATGCCGA	30
K550	<i>amsA</i>	K550S	TTGATAAAATAGATCTGGGCCACGCTCGGA	30	K550T	TTGATTCTTATGCATGATATGATATGAA	30
K551	<i>amsB</i>	K551S	TTTTGAAAAATGCATTAATCTCCAGT	30	K551T	TGAAAAGCAAGATCTCGCATTTATGAAA	30
K552	<i>appB</i>	K552S	GGAAAGTGCAGATCTTACGGCATGTGCT	30	K552T	TTTCATAATCATGCATGATTTTCTCTTTA	30
K553 (N)	<i>appC</i>	K553S	CGCCATCTGAAGATCTGATGAATGGCCTAC	30	K553T	CAATGACATCATGCATGCGCACTCTGTAG	30
K554	<i>araA</i>	K554S	TATCAAAAATATGCATTAATGTTCTTAT	30	K554T	ACGGCCCGCGAGATCTGAACGCTAACCAAC	30
K555	<i>araB</i>	K555S	CAATTGCAATATGCATGTTTCACTCCATC	30	K555T	GATTTTTCACAGATCTCTGACCGCGAATGG	30
K556	<i>araC</i>	K556S	ACTCAATGAAGATCTCGGATGATCGGA	30	K556T	TTTGCGCTTCATGCATACTTTTCACTCTC	30
K557 (N)	<i>araD</i>	K557S	TGAGATCTTCATGCATGTTTGACTCCTTCT	30	K557T	GGCGAATGCGAGATCTAAAGCCCAACCGGA	30
K558	<i>ascB</i>	K558S	CATTGAGACAGATCTGAAACGGCAAGA	30	K558T	CTGGAAATACATGCATTTTCACTCTCAAT	30
K559	<i>ascG</i>	K559S	GCATCGTGTATGCATTTTCACTCCCTTAC	30	K559T	TGCATATCTAGATCTGACGGCTGACGACT	30
K560	<i>atoA</i>	K560S	GATAGCCAAATAGATCTGCGTTTGTGATAC	30	K560T	GTTGTTTGCATGCATTAATTTGCTCTCTCTG	30
K561	<i>atoB</i>	K561S	ATTGCGGTTAGATCTTACATAAAACGCCA	30	K561T	TGACACAATATGCATTTATTTCTCTCTC	30
K562	<i>hglA</i>	K562S	CATAACTTACAGATCTGAAACGTACACGCA	30	K562T	GTTTTTTCACATGCATAGGCTCCAGATGAG	30
K563	<i>hglB</i>	K563S	CTGGAAGTGCATGCATAATTAATCTCTTTT	30	K563T	GGTGCCCGCGAGATCTAAACACCGAGGGT	30
K564	<i>hglF</i>	K564S	TGGCTAATCTATGCATAAATGCCCCTTAC	30	K564T	CTTTATTGCGAGATCTTGCTGATGCCCA	30
K566	<i>cadA</i>	K566S	TTCGATAAATCATGCATGCTCATCTCCAG	30	K566T	CCGCTAACGAAGATCTCTCCGGAAGTTT	30
K567	<i>cadB</i>	K567S	TCTTGGCGAATGCAATGCTCTTCTCTAAT	30	K567T	GAAAGCACTGAGATCTAATCTACCGCCTTT	30
K568	<i>celD</i>	K568S	TCACCTGGCTGATGCATGCACTCTTATGCC	30	K568T	ATCGCAACGTAGATCTATCTGCCCTTTGTT	30
K569	<i>cpbBimamC</i>	K569S	GTTTTCGATGATGCATAATTAATCCCGAAT	30	K569T	CGGCAATATAGATCTAAGCAGGGGCTGGA	30
K570	<i>cybB</i>	K570S	GGGCGGAAATAGATCTTCTTTCGCAACAG	30	K570T	AATTTTCGATGATCAACCGGCTTTTCTC	30
K571	<i>cybC</i>	K571S	TCGACGAGATAGATCTAGAGATGGCGACCG	30	K571T	CGTTGAGGATGATGCATTTGTTCTGAGAT	30
K572	<i>cydA</i>	K572S	ATTAGCCAGATAGATCTAAAGAAATTAAGG	30	K572T	CTAATCTAAATGATGACTCTTGCTCAT	30
K573	<i>cybB</i>	K573S	CTGAACCGCTAGATCTCAACAGTGGCTGAT	30	K573T	CTTCAATATCATGCATTGACGACTCTGTT	30
K574	<i>cyoR</i>	K574S	TATGTCGGAATGCATTCGCAACCTATAAG	30	K574T	GCGCGCCTCAAGATCTACGCGGGCTGATC	30
K575	<i>cyoB</i>	K575S	ATAATTTCCATGCATCTTATTTCTTCTCTC	30	K575T	GAAATCGCTTAGATCTCGAAACACTCCGGTG	30
K577	<i>cyoD</i>	K577S	CGGTAGAATGATGCATACATCGCCCCAT	30	K577T	GATGAGCGACAGATCTGTGTTCTCTATCTT	30
K578	<i>cyoE</i>	K578S	ATTGCTTAAATGCAATAACCGCGCTCTTA	30	K578T	GTTGCGACGTAGATCTTGTTCTTATCGGCA	30
K579	<i>dadA</i>	K579S	CGCTGGAGTAAGATCTCATCATCTGTTCTG	30	K579T	GTAATGACAACATGCATAGCACTCCGATAA	30
K580	<i>dad2/dad2</i>	K580S	GTTGATATTCAGATCTATCGCTGAAAGCG	30	K580T	GTAATGCGACGATGCATCTGTTCTCTTACG	30
K581	<i>dglA</i>	K581S	GGTTGCTACGAGATCTATCGAGATATCGT	30	K581T	TGGTATTAATGCATGAAAGAACCTTTGT	30
K583	<i>dlid</i>	K583S	GAAAAGAGGAAGATCTAGGCGGCTTAATTC	30	K583T	TTGTCTATGGAATGCATTTTCCACTCTTGT	30
K584	<i>dmuA</i>	K584S	GTTGATGCAAGATCTTTGCGCGACGAAT	30	K584T	ATGCGCTGCTATGCATGCGCAGGCGCGGA	30
K585	<i>dmuC</i>	K585S	GCTTCCGCGAGATCTTGAATATGCTGGCG	30	K585T	GCCATCCATGCATCATCAACCTCTCTCT	30
K586	<i>dmuR</i>	K586S	TGCTTTTTCATGCATGTTGTTGTTCAATAG	30	K586T	AATTGCTACGAGATCTCAACTTTAGGACA	30
K587	<i>dsdA</i>	K587S	CACGAAAGGGGATGCATAATCACTCATTTT	30	K587T	GAAAGCGACGAGATCTGTTGAAGTGTGAGA	30
K588	<i>ebfC</i>	K588S	GTACGCGAAGAGATCTTGGCGCGCGCGGT	30	K588T	AATCGGAACCATGCATGTTGATGTAGTTT	30
K589	<i>ebfC</i>	K589S	AATTAACGCGAGATCTGATCAGGTGGCGTA	30	K589T	TATCGATGATGCATGTTTATTTCTCGCT	30
K591	<i>edl</i>	K591S	ACAATTTGGATGCATAAAGGCTCCTGAAA	30	K591T	CTGCAATCAAGATCTTGGATCTGAGCTAT	30
K592	<i>eno</i>	K592S	TTACGATTTTGTGATTAAGTTTCTCTCAA	30	K592T	TTTGTGCGAGAGATCTAGTACCGGTTGTG	30
K593	<i>exaR</i>	K593S	GTTTCCGCTAAGATCTTCTGAACGCTGGGT	30	K593T	TATGCGCTTCAATGCATGATCGGCGAGCTA	30
K594	<i>fldA</i>	K594S	TGACAACCTGATGCATTTGACTCCTTAAG	30	K594T	CAGCGGATGCGAGATCTTATACCGGATGCC	30
K595 (N)	<i>fadB</i>	K595S	CGCCTTTTGAATGCATGATGCTCTCTGAA	30	K595T	CAGCGGATGAGATCTACATCTTCACTGCA	30
K596	<i>fadD</i>	K596S	GCCAAACCTTATGATCTTCTCACTCTAA	30	K596T	GAACTTCTTCAGATGCATTTATGCGGAT	30
K597	<i>fadH</i>	K597S	GCTGACAGCGAGATCTCAAGCGCACCAAA	30	K597T	CGCAGCGGTAATGCATAAAATGTCACGTA	30
K598 (N)	<i>fadR</i>	K598S	AGTAACAGCAAGATCTCAAGATTGCGGCC	30	K598T	GCGGCTTAATGATGATGATGAGATTCCAT	30
K599	<i>furR</i>	K599S	AGGGCTTGTGATGATCTTTTATGATCTAT	30	K599T	CATATGCTGAAGATCTGCTCTATTGGGGGG	30
K600	<i>fba</i>	K600S	CAAAAATCTTATGCATGTTCTTGTCTGT	30	K600T	ATGCTTCCGCGAGATCTAGGCTGAAATCC	30
K601	<i>fldD</i>	K601S	CGGAGTGGATAGATCTCAACAGGCCAGCGC	30	K601T	GCTGTGTTTTATGCATTTTCTTCTTAACCA	30
K602	<i>fldH</i>	K602S	TTATGCGAATATGCATTCAGTCTCTTTTC	30	K602T	CTTCAACTGGAGATCTCAAACTATGGGCAC	30
K603	<i>fldH</i>	K603S	TGACGACTTTATGCATCGTCTGCTCCAG	30	K603T	GATTGAACGTAGATCTCAGTCAGTACTGAA	30
K604	<i>fldG</i>	K604S	CACCTCAATCAGATCTTGATGGTTCGGCG	30	K604T	TGCGACTGACATGCATGCTTCTCTCTTT	30
K606	<i>fldA</i>	K606S	ACGCTAACCGAGATCTGATTTCCAGTCGG	30	K606T	TTTTGACTTATGCATGATGATCTCTCTCG	30
K607 (N)	<i>fldG</i>	K607S	TTCTGCTGACATGCATGGATGCTCTCTGT	30	K607T	CAACCCATAAAGATCTGGCTGGAAAGCTCA	30
K608	<i>fldH</i>	K608S	GAGATTGATAATGCATGTTGCTCTCCGTT	30	K608T	CACCTACGAGAGATCTAAAGCGCGTGGGA	30
K609	<i>fldI</i>	K609S	TGTCACGTGATGCATTTGGCGTCTCTGTC	30	K609T	CCAGTCCGAGAGATCTATTGGCTCGGGTA	30
K610	<i>fldX</i>	K610S	TAAACAATCTTATGCATATTAACCTGTC	30	K610T	AGGACTCGCGAGATCTGCGCGCTTTTGGCG	30
K611 (N)	<i>fldA</i>	K611S	TGCCAGTGAATGCATGAGTGAATAACCT	30	K611T	GACTCATCGAGATCTGATTAATGGGCGGT	30
K612	<i>fpr</i>	K612S	TTACCCAATCATGCATGTTTCTCTCTGTT	30	K612T	CTAGACAGCGAGATCTACGTGCTGACGGT	30
K613	<i>fldA</i>	K613S	CTTGAAAGGTATGCATGATCTCTCCAGA	30	K613T	CCCGGGGCCAAGATCTGCTGCTCAACCGG	30
K614 (N)	<i>fadB</i>	K614S	TTTTATCTCATGCATTCGGCTCTCTCTCT	30	K614T	AGGCAGCTGGAGATCTCAACGCTCTGAAGG	30
K615	<i>fadC</i>	K615S	TACGTTTAGTATGCATGTGCACTCTTAG	30	K615T	CATGTAACAGATCTGCGTGAATACACCG	30
K616	<i>fadD</i>	K616S	GATTTGGATATGCATCTCAGGCTCTTAC	30	K616T	CGAAGTCTGAGATCTCACTGCTGATCCGG	30
K617	<i>fukK</i>	K617S	CAACACGTCATGCATTAATGCGCCCTCCAC	30	K617T	ATAGCGCGGAAGATCTTCTGCTAGCGGGA	30
K619	<i>furR</i>	K619S	CGATGAAAAAGAGATCTGAGCAGATCGAAA	30	K619T	TTTCACTCAGATGATAAATGCCCCCTTGGC	30
K620	<i>fucA</i>	K620S	GTTTATTTCGATGCATGATGATCTCTCTC	30	K620T	TATGTTTCAAGATCTCAAAACCGAGAGT	30
K621	<i>fucI</i>	K621S	GAGCTATTGAGATCTTACGCTGTAGAAGA	30	K621T	AGCTGATTTTATGCATTAAGATCTCTAC	30
K623	<i>fucO</i>	K623S	TTCTGTTAGCATCATCTTCTCTGTTGTT	30	K623T	TGCGATATTGAGATCTTTGATGGCAACGGT	30
K624	<i>fucR</i>	K624S	CGCAAACTGAAGATCTATTATAGAGGAAG	30	K624T	GGCGTTCGCGCATGCATATTTTCAACCCAT	30
K625	<i>fumA</i>	K625S	AGGGTTTGTATGCATGTTTCTCTCACTTA	30	K625T	TTCAAGAAATGAGATCTTTTGGATGAACCTG	30
K626	<i>fumB</i>	K626S	AGGGTTTGTATGCATGATCTTCCAGCCTGT	30	K626T	CGGTTCCGGTAGATCTGCACTGCTGGCGGT	30
K627	<i>fumC</i>	K627S	TGCGTACTGTATGCATGACCTGCTCTCAC	30	K627T	CCAAAACCGAGATCTTATGCTCTCGGTT	30
K629	<i>galK</i>	K629S	TTTCTTCAGATGCATTTCTTCACTCCGG	30	K629T	GCTGAGCGCGAGATCTGCGCTGCAAAAAGAA	30
K630	<i>galR</i>	K630S	CGACAGTAAAAAGATCTCGCAAAAAAACCT	30	K630T	CTTTATGGTATGCATGAAATACCTTAGT	30
K631	<i>galS</i>	K631S	CACGATGGTATGCATATCACTACCTGTT	30	K631T	TGTGCGCTTCAAGATCTAAATGCGCGGGGAA	30
K632	<i>galT</i>	K632S	GATTAATGATGCATGGTCGTTCTCTAAT	30	K632T	AGCATTGCCCAAGATCTGCTACTTCAACCG	30
K633	<i>galU</i>	K633S	CAAAAATCAACAGATCTCAGAGTTGGGCGCG	30	K633T	TATTAATGGCATGCATTAATCTCTCTCG	30
K634	<i>gapA</i>	K634S	TGGTTTGGGAAGATCTCAGCGGGGCAATCC	30	K634T	CTACTTGTATGCATATATATCCACAGCT	30
K635	<i>gapC</i>	K635S	GGGCGGAAATGATCTTCTTCCACCAAG	30	K635T	AATTTCCGTAGATCTAACGGGCTTTCTCT	30
K636	<i>galD</i>	K636S	TCACCACTGAATGCATAAAATCTCTGATT	30	K636T	TCCGCGGTTGAGATCTGGACATACGCGGCT	30
K637	<i>galR_1</i>	K637S	CTTCGCGGATATGCATTTGCTACTTCCGC	30	K637T	GCCGCTGCGGAGATCTCGGAGCACCGCGGA	30

K638	<i>gpd</i>	K638S	TATGTGTTAATGATGATAAAGAGACACCAIT	30	K638T	GAGTCGATGAAGATCTCAACAATCAGCACG	30
K640	<i>gfpA</i>	K640S	TGAATTTGCGAAGATCTATAAGCAATCGAGA	30	K640T	AGTCGCGAGTGAATGATGTTATCCCTCTGGA	30
K641	<i>gfpB</i>	K641S	CGGTATGCTGAGATCTGGGCAACACGCGCC	30	K641T	CAGTATCAAAATGCAATCTTCTGCTCCTTC	30
K642	<i>gfpC</i>	K642S	AACGCTGCCGAGATCTGTGCTGGGCAATCG	30	K642T	AGCTGGTGTTCATGATGTTGGGCTCTCTG	30
K644	<i>gfpE</i>	K644S	ATTGGAAGTATGATGATGCGTCTCTCTTCT	30	K644T	ATCGTACATAAGATCTCAATGGCAATCAT	30
K645	<i>gfpG</i>	K645S	AGGTATCATATGATGATGCTGTGCTGCTT	30	K645T	CGAACATATAGATCTGAATCGGCTTGA	30
K646	<i>gfpR</i>	K646S	GTGTGTGTTGATGCAATTAATAATCCCTGG	30	K646T	TGCAAAATCTAGATCTTCAGGAAGTGAITG	30
K647	<i>gltA</i>	K647S	CTTTGTATCATGCAATTAAGGTCTCTCTTA	30	K647T	GCTCGGGATTAGATCTGTGTCGGAGACCT	30
K648	<i>gnd</i>	K648S	TCGTGTCATGATCATACATCTCTGCT	30	K648T	AGCCGAGAAGAGATCTCCCGCTTATCGCA	30
K649	<i>gntR</i>	K649S	GTCTTTTCTTATGATCGTCTCTGAAGGTAC	30	K649T	TCGATGCCGTAGATCTCAACAGCTGGTGC	30
K650	<i>gpmA</i>	K650S	GCTTAGTACATGATCACTTACTCTCTCA	30	K650T	GGTACGATCAGATCTTCTGTTACAGGCC	30
K652	<i>gutM</i>	K652S	TTGCGTGTGAGATCTCGGACGGGATTCAC	30	K652T	TGAGTGGGAATGCAATACTTTTCTTAAAT	30
K654	<i>hlyB</i>	K654S	GATGAGCGCCAGATCTACTTACATGGTGAC	30	K654T	CGTACTGATGATGATGCTGTTTATCTCTC	30
K655	<i>hlyC</i>	K655S	CGCATGATGATGATCTTGAACCTGCCCTT	30	K655T	CGCTTCTCTGATGATGATCTCTCTTC	30
K656	<i>hlyD</i>	K656S	CTTCAGCGCCAGATCTGTTTACCGTGGT	30	K656T	CGCGTGTCTCATGATGAACGCTCTTGTT	30
K657 (N)	<i>hlyE</i>	K657S	GCGGTGGCGAGATCTCTGTATGCCAATTA	30	K657T	CGGTGTGTTATGATCTCCCTGCTCTCTG	30
		K658S	CGTGGGAATAGATCTGCAACGGCTAATG	30	K658T	AAAAAGTTTTCATGATGAGGCAAGCTCTG	30
K659	<i>hlyB</i>	K659S	AATTACGCTATGATGGTTATCTCCCCG	30	K659T	TGCGACATCAGATCTTACGGCAAAACGCC	30
K661 (N)	<i>hlyB</i>	K661S	GTGGATCATGATGATGCTGCTCTCTCCG	30	K661T	CTGTCCGTAAGATCTGCGGAAGTACGACT	30
K662	<i>hlyC</i>	K662S	TAATCTCTGATGATGCTTTGCTCGCTC	30	K662T	GGGCTTCTCGAGATCTATCTTGAAGGTTT	30
K663	<i>hlyD</i>	K663S	AGACTAAATATGATTACAGAACTTCTAC	30	K663T	CAAACTGAATAGATCTGTGGCATTTATCA	30
K664	<i>hlyE</i>	K664S	CTATCTCTTATGATGAATCGCTCCGCT	30	K664T	AACGAAGTGGAGATCTTGAAGTTTCTGTAA	30
K665	<i>hlyF</i>	K665S	GAGACAACCTCATGCAATTTCCGCACTCTG	30	K665T	ATCTGCGGTAGATCTTCCACGGGAGGCG	30
K666	<i>hlyG</i>	K666S	GAAAGCAATATGATCAATTAACCTCGGTT	30	K666T	CTGTGTCTGATGATCTGCGCTTTCCGACA	30
K667	<i>hlyN</i>	K667S	TGATGAAAGATGATCAAAATCTCCAGCA	30	K667T	AACCTTACGAGATCTTAAAGGACGCTG	30
K668	<i>hlyP</i>	K668S	ATGCGGTCAAAGATCTGTTGCGCTGCGCA	30	K668T	GGGTTATTTATGATCAATCGCTCCCATAT	30
K669	<i>hlyP</i>	K669S	TAAACCCAGGATCTACGGAAACCTTAAT	30	K669T	GAAACGCTTATGATGATGCTGTGCTCCAG	30
K670	<i>hlyP</i>	K670S	AACACAAAGTATGATCTGCTTTCGTTACCG	30	K670T	CATCAACAAATGATATTTTCTCTCCGC	30
K671	<i>hlyP</i>	K671S	CAGCGATTGATGATCTCCGCTGGTGGTGC	30	K671T	TGATTAATGATGATGATGCTGCGCCGCGC	30
K672	<i>icaA/icdE</i>	K672S	ACCTTCCACGATCTTAATGATTTTTC	30	K672T	CTACTTACTGATGATCACTCTCTCTG	30
K673	<i>idsK/gntV</i>	K673S	AATGCAATAGATCTTGACCGACGCGTGT	30	K673T	AGCTTTACCATGATCTTAAATCTCTCGA	30
K674	<i>ldgK</i>	K674S	AGAGAAATTAATGATCTCCGGTACAAAATC	30	K674T	CATCACTTTTATGATAGGACATCTTGAT	30
K675	<i>ldgR</i>	K675S	GATGCGGTATGATTAATCACTTACCT	30	K675T	GATGACACGAGATCTGGTGAGCATTTGCA	30
K676	<i>lucA</i>	K676S	TCATTGGCATATGATGCGATCACTCCGT	30	K676T	CGAATTACTTAGATCTTCGATTAATGTTCT	30
K677	<i>lucI</i>	K677S	ACGTACTGATGATCAATCAACACCTTGA	30	K677T	TTCAACGGGAGATCTCGGCGACGTTTGC	30
K678	<i>lidD/icdD</i>	K678S	GCTAAAAACAGATCTGCCGATGATCCGGA	30	K678T	CTCGGAAATGATGATGCTGTTTCTCCCT	30
K679	<i>lidB/icdR</i>	K679S	ACTGCTCTGAGATCTTGCTGAAGATGAA	30	K679T	TGGGTAAACATGATCAAGGAATCATCA	30
K680	<i>lpsA</i>	K680S	CCGGAAGTGGAGATCTTCGGGTTTCCAAG	30	K680T	TGATTTAGTATGATCATGACCTTAAT	30
K681	<i>malI</i>	K681S	TTTTGGCGTATGATGATGATGACTACT	30	K681T	GAAAGTTTACCAGATCTTCAATTACCGATA	30
K682	<i>malM</i>	K682S	CGAATCCAGAGATCTGGGCAACAAGAA	30	K682T	TTTTATTATATGATGTTTTCACCTCAA	30
K683	<i>malP</i>	K683S	AAATAGGTTGATGATAGAGTTCCACTTT	30	K683T	AGCGATGACGAGATCTATGTTGTTCTGAAT	30
K684	<i>malT</i>	K684S	GAGGAGTTGATGATCTGAGCAAGGAATGT	30	K684T	TTGACGGAATGATGATGATTAATCACTTCA	30
K685 (N)	<i>malY</i>	K685S	GGCTTACCGAGATCTCTGTCTCGGCTC	30	K685T	TTGAAAAATCATGATCACTTATCTTAATG	30
		K686S	GACTACCGGAGATCTTTGCGGTGATCT	30	K686T	ATGCAATTAATGATCAATATCCCTGTGAT	30
K687	<i>munA</i>	K687S	CTGACAGGTATGATCTACCGCTTTCCGCGC	30	K687T	TAATGAGTTTATGATGATCAATCCCTGTT	30
K689 (N)	<i>melA</i>	K689S	GGCCAGAACAGATCTATATGACCTGATT	30	K689T	TGGGTGAGAAATGATGATGATCTCTCGG	30
K690 (N)	<i>melR</i>	K690S	ACGTATGTTGATGATGATGCTCTCTTT	30	K690T	ATCCTCTAAGAGATCTTTCTGTGGGTGTG	30
K691	<i>melD</i>	K691S	CGACTATCTAGATCTGTCTATCGCGGTGC	30	K691T	AATGATGCTGATGATGATTAACCTTCA	30
K692	<i>mtfR</i>	K692S	TAAACTCTTCAGATCTAACACGGGTATGC	30	K692T	CGCGCTGCTCATGATGATGATGCTT	30
K693	<i>narG</i>	K693S	AACCGTTACTAGATCTACTTCGGGTATAC	30	K693T	CCAGGAATTTATGATCGGCTTTCTCTGT	30
K694 (N)	<i>narH</i>	K694S	AGGCCAGAAAAGATCTGGCAACAGGAAA	30	K694T	GTGAACGAATATGATTTTACGCTCTCTG	30
K695	<i>narI</i>	K695S	GTTCGACCGTAGATCTGCCACGTCACTGTT	30	K695T	TATTCAGGAATGATGATGCTGCTCTCC	30
K696	<i>narJ</i>	K696S	GCTCGCGGTAGATCTGAATATGACACACT	30	K696T	TCACGAGTTTATGATGATGCGGCTCCGT	30
K697	<i>narV</i>	K697S	CAGATAGTAAATGATCTCCACCTCCGCA	30	K697T	TGACCGCGGAGATCTACGCTGCTGCTG	30
K698	<i>narW</i>	K698S	CTTTGAGGATATGATTAATGCCCTCCGC	30	K698T	CCCTGAATACAGATCTGCGGATGGTCTG	30
K699	<i>narY</i>	K699S	GTGAACGGAATGATCTTTTTCGCTCTCTG	30	K699T	CCAGATACCGAGATCTGGCTCCCGGAAA	30
K700	<i>narZ</i>	K700S	CCAAAAATTTATGATGATGATGCTCTG	30	K700T	ACGTTGATCAAGATCTTTTATGCGGAT	30
K701	<i>nbl</i>	K701S	ACATCTGAAGAGATCTATCAATTAACGAG	30	K701T	TCAATGGCGTATGATGATGATACCCCTTAA	30
K702	<i>nirB</i>	K702S	ATCTATACCAAGATCTCACCTGGGTTCAC	30	K702T	GTCTGACTTTATGATCTTTGCTCGATTT	30
K703	<i>nirD</i>	K703S	GTTCGGTGTGATGATCTTGATCCGTGAATG	30	K703T	CTTTCACCTGATGATGATGCTGCTCCAC	30
K704 (N)	<i>nlp</i>	K704S	CGACGATGATGATCTGTTAAACGACGCT	30	K704T	TGAAATATCATGATCTTTTCTCACTCTC	30
		K705S	GTTCGCCCCAAGATCTATCAGGTACGTTAA	30	K705T	TTTTTATCTATGATAGGGGCTTCACTCG	30
K706	<i>nrfB</i>	K706S	GGACAAAGTATGATCTAAAAAGTGTGCG	30	K706T	ATACGCTCATATGATCTTCAATGTTTATG	30
K707	<i>nrfC</i>	K707S	CTGTTGTGAGATCTAACGGAATTACCGC	30	K707T	GACGAGCAATGATGATGCTCTCTTATG	30
K708	<i>nrfD</i>	K708S	CTGATGGATGATCTCGGGAAGTGAACAA	30	K708T	CGGAAGTCTGATGATGCTGCTCACTCC	30
K709	<i>nrfE</i>	K709S	CGTTCCTCAAGATCTGATCTGCGCGGTGC	30	K709T	TCAACGGGTATGATGATGATGATGATGAT	30
K710	<i>nrfF</i>	K710S	CGTTTGGTGTAGATCTGCTGGTGTGATG	30	K710T	GAAAGCCTTATGATGATGATGATGATGAT	30
K711	<i>nrfG</i>	K711S	GTCATGGGGAGATCTCTGGCGGATGCT	30	K711T	TTTTGGGCTGATGATGATGATGATGATGAT	30
K712	<i>nuoA</i>	K712S	ATGTTGACATATGATCTTACTCATCAA	30	K712T	GTACAAAATGATCTTTTCAACACACAG	30
K713	<i>nuoB</i>	K713S	TGAAGCTATAATGATCTTAAATGCTCGCG	30	K713T	TGGCGTCCATGATCTTGAAGAGCAGTGAA	30
K714	<i>nuoD</i>	K714S	TCATATTGTATGATGATGATGATGATGAT	30	K714T	TTTGGCGAGAGATCTGCTGCTCTCGCG	30
K715	<i>nuoE</i>	K715S	GTGATTTCTATGATCAATTAAGCGGTCCAG	30	K715T	TGCTACCGGGAGATCTTTCAGCTGCGTAA	30
K716	<i>nuoF</i>	K716S	GGATAATGTTATGATCTTATACCGTCCAG	30	K716T	CAGATGTTGGAGATCTTATGATGATGATGAT	30
K717	<i>nuoG</i>	K717S	TTGTAGCCATATGATCTTCCAGTTTCT	30	K717T	GGCAGCCAGGAGATCTGGGAGTCACTTCC	30
K718	<i>nuoH</i>	K718S	GTGATATCAATGATCTTGTGTGCTCTCT	30	K718T	CTCGATGGAAGATCTAACGAGCCGATGC	30
K719	<i>nuoI</i>	K719S	ATTCTTTTAAATGATGATCTTATGCTCC	30	K719T	CCTCGGCTTAGATCTATGCGGCTGTGGC	30
K720	<i>nuoJ</i>	K720S	AAAAAGCGAAATGATGCTTCTCTCTCTTA	30	K720T	GGTTCGTAGTATGATGATGATGATGATGAT	30
K721	<i>nuoK</i>	K721S	GTGTGAAGGATGATGATGCTCTCTCTCGT	30	K721T	CATACTGCGAGATCTGAGTATGATGATGAT	30
K722	<i>nuoL</i>	K722S	AGGCAAGCATGATGATGCTGCTCTCACT	30	K722T	TCGTTGTTAAAGATCTGGGATGATGATGAT	30
K723	<i>nuoM</i>	K723S	GCCAGGGTAGATGATGCTGGCGATCTTATC	30	K723T	CTGGCGTGTAGATGATGATGATGATGATGAT	30
K724	<i>nuoN</i>	K724S	GCGCGTAAATGATGATGCTGCTGCTGCG	30	K724T	ACCGGTAATGATGATGATGATGATGATGAT	30
K726	<i>pfkA</i>	K726S	ATTTTATATAAGATCTTACGATGGGATAT	30	K726T	CGATTTCTTATGATGATGATGATGATGATGAT	30
K727	<i>pfkB</i>	K727S	GCAGTGTGTGATGATCTACAGGTCAATGGT	30	K727T	TATAGATGATGATGATGATGATGATGATGAT	30
K728	<i>pgi</i>	K728S	CGTGTACGGGAGATCTTTTACGCTTGGC	30	K728T	GATTGATGATGATGATGATGATGATGATGAT	30
K729	<i>pgk</i>	K729S	TCCTAATATGATGATGATGATGATGATGAT	30	K729T	CAGGTTATGATGATGATGATGATGATGATGAT	30
K730	<i>pgm</i>	K730S	AGCATATCGAGATCTCGATCCGACATT	30	K730T	GATTGTGGATGATGATGATGATGATGATGAT	30
K731	<i>phnF</i>	K731S	GTGTAGACAAATGATGATATCAATGCTT	30	K731T	TGGTGGCTGAGATCTTACAGCCGCTTC	30
K732	<i>phnG</i>	K732S	CGGTATCTGATGATCTAGTGCCTTCAATG	30	K732T	GTCGCGGTGAGATCTGATGCGCGCTTC	30
K733	<i>phnH</i>	K733S	CGGTTTCCAGATGATGCTGCTCTCGCG	30	K733T	CAGCCCGCGAGATCTCCGCTAGCTGAC	30
K734	<i>phnI</i>	K734S	TCACGGCAATGATGATGATGATGATGATGAT	30	K734T	GCCATGAGAGATCTGCGGTGATGATGATGAT	30
K735	<i>phnJ</i>	K735S	CGCTCAGATTATGATGATGATGATGATGAT	30	K735T	CGCCCGGCTGATGATGATGATGATGATGAT	30
K736	<i>phnK</i>	K736S	GTAACGGTTGATGATGATGATGATGATGAT	30	K736T	CATCCCCGAAAGATCTTTCAGCCGAAGATCA	30
K737	<i>phnL</i>	K737S	TTGTACGTTATGATCTTTTCCGCTCTGGG	30	K737T	CGCGGATATGATGATGATGATGATGATGAT	30
K738	<i>phnM</i>	K738S	CGTTATGATATGATGATGATGATGATGATGAT	30	K738T	GTACGCCAACAGATCTCCGACGAAGGTCA	30

K739	<i>phnV</i>	K739S	TCAGTTTTCATGCATCAGAACCCCTTTT	30	K739T	GTCCGACCCGAGATCTGAATCCATGCCGC	30
K740	<i>phnO</i>	K740S	GCTCAACAAGCATGATGGTTTCTCTTC	30	K740T	GGCCGCTCCGGAGATCTGAAGACACGCTGC	30
K741	<i>phnP</i>	K741S	TGAGGGTCAAGATGATTTACAGCCCTTG	30	K741T	CCATACGCTCAGATCTGACGCGAGCTGGC	30
K742	<i>phnA</i>	K742S	GAGAGAGATAAGATCTATAACTTTATTIA	30	K742T	GTCTCGGCCGATGCATCTTATGACAGCTG	30
K743	<i>pldA</i>	K743S	TAAAAAGCTCAGATCTGCTGGCGCAGAT	30	K743T	CCTCGAGAGTATGCATCGGTCTGTCTTCC	30
K744	<i>pldB</i>	K744S	AATTGCCGAAAGATCTCCGCCAGAAACACA	30	K744T	TTTGCTGCTGATGCATCGGGTAATCGCT	30
K745	<i>ppk</i>	K745S	CACATGCCGAGATCTTGCTGAACATTAC	30	K745T	GCTTTTCTGATGCATTAACCACTTTTACTC	30
K746	<i>ppx</i>	K746S	ACCGCGAGATGATCTCGCGCAGCAAGGGC	30	K746T	TATCGTGTATGATCATTAGGGTTATTCAGGT	30
K747	<i>psfF</i>	K747S	AAAATGAGAAAGATCTTTTCTGCAAGTTG	30	K747T	CACCAICCCATGATGATGTTTAACCATGAG	30
K748	<i>pta</i>	K748S	CCTGCACGACAGATCTGGCATGAGCGTTGA	30	K748T	TAATAATACGATGCATGTTTATCTCTTT	30
K749	<i>putA</i>	K749S	TGGTGGTGGTATGCATGCCATTACTCTGT	30	K749T	AGTTTTCGTAGATCTCCAGGCGATAAACC	30
K750	<i>pykA</i>	K750S	ATGATATCTGATGATCTACGCATGAGTGTGA	30	K750T	GAAGCCTTCTATGCATGTAATACCTCGTTG	30
K751	<i>pykF</i>	K751S	AATCTAACCAAGATCTCAAAATCAACAAA	30	K751T	TTTTGGTCTTATGCATGACAGTCTTAGTCT	30
K752	<i>qor</i>	K752S	CAATCTGTTGATGCATGTGCTCCAGAAC	30	K752T	GCTTCGGCAAGATCTTCGCAACCCGAGATC	30
K753	<i>rbsK</i>	K753S	CGAAGGCTTCAAGATCTGCCGTGTGCTCA	30	K753T	TGCTTGCCTTATGCATATCGGGATGTCCA	30
K754	<i>rbsR</i>	K754S	ATGCAGCTGGAGATCTCACTCGAAAGTTGT	30	K754T	CTTTCAITGTATGCATGCGTCACTCTGCC	30
K755	<i>rhuA</i>	K755S	CCAGTTTGAGTATGCATGGCAAGCTCTCT	30	K755T	GCTTATCTCCAGATCTCAGGCACTTCGCCG	30
K756	<i>rhuB</i>	K756S	AATTGCCGAAATGCATAATGTATCTGCT	30	K756T	CGGTATGTTAGATCTATGCCGATCATGAT	30
K757	<i>rhuD</i>	K757S	GAGTAATGTTATGCATGTTCTGTGTTCTGT	30	K757T	GCAGGTAGCGAGATCTGGAGAGCGGTGCGG	30
K758	<i>rhuR</i>	K758S	TGCCACAAGAAATCTTGGCGAGTATCCGT	30	K758T	TATTCGAGAAATGCATCCGCTCCCTGGCGA	30
K759	<i>rhuS</i>	K759S	TGCTATCATGATGATCTCCCTCTCGCACA	30	K759T	TATGTAATACATGCATACGGCTTCGAT	30
K760	<i>rpiA</i>	K760S	ATTCAICTCTGATGCATGATGTTTCGCTGT	30	K760T	ATGCACAGTAGATCTCCGCGCGCTCAAAAT	30
K761	<i>sdaA</i>	K761S	GAACTGGAAGATCTTCGCTATACGCCCT	30	K761T	CGAATAGACTATGCATGTAATACCTCTGA	30
K762	<i>sdaB</i>	K762S	CTGGCTCGCGAGATCTAGCAAGACATCTCG	30	K762T	CGAATACGCTATGCATAGAGAAATACATCG	30
K763	<i>sdaB</i>	K763S	TTATCATCTGAGATCTCCTTACCCTCTGG	30	K763T	TGACTGGCAATGCATCACACCCCACTAC	30
K764	<i>sdaB</i>	K764S	ATGCCCGAGCAGATCTCACTGCGGATGCC	30	K764T	AAAACCTGAGATGATTTCTGTCTCCCGC	30
K765	<i>sdaC</i>	K765S	GCATCCGAAAGATCTAATCTGTCTACCAC	30	K765T	TCACATTTCTATGCATGAATAACGCCACA	30
K766	<i>sdiD</i>	K766S	GTTATAGAAAAGATCTTGTCTGACCCGCAA	30	K766T	AGGCGTGTGCTATGCATAGGAGACTCTTGC	30
K768	<i>sucA</i>	K768S	AAGTTTATCGAGATCTCAGGCTGTGACGG	30	K768T	AAGCCGCTGTTATGCATCGTATCCTTAAG	30
K769	<i>sucB</i>	K769S	CGGGATGCGTATGATCTCTGGTCTGATGTC	30	K769T	TATCTACGCTATGCATGTGTATCTTTAT	30
K770	<i>sucC</i>	K770S	GGTGGTGTGTAGATCTCCCTGATGCTACG	30	K770T	ATTCACTAAATGCATGTGTGTCTGCTATC	30
K771	<i>sucD</i>	K771S	CGCTGACGGCAGATCTGTGCTTCCGCCAGCC	30	K771T	CGATTAATATGCATATTTTCCCTCCAC	30
K772	<i>talA</i>	K772S	CACCGCCGTAAATCTGAGATCAACGCCAC	30	K772T	CGTCTAACTCATGCATAGAAATACTCTTT	30
K773	<i>talB</i>	K773S	CGCCGGCCAGAGATCTGCTACCCACGCGCG	30	K773T	TCAATTTGTATGCATGATGATTTCTCT	30
K774	<i>tdcA</i>	K774S	GAAATAGTATGATCAATAACGACCTACGTTA	30	K774T	ATTCACAAAAGATCTCCGTGAGAGAGAGA	30
K775	<i>tdcR</i>	K775S	TAAACCAATAGATCTAGGAAAACCAAATG	30	K775T	TGGTATCCCATGCATTTTTTTGACAAAA	30
K776	<i>tdh</i>	K776S	TGGATAACGATGCATCTACATCTCAAG	30	K776T	GTGATGGCCGAGATCTATATATCAACGGGT	30
K777	<i>tdhA</i>	K777S	CTTTACGTGAAGATCAATTTTGACTCCAGATC	30	K777T	AGCGCATTTGGAGATCTTTGTGCAGACGTTA	30
K779	<i>tnaA</i>	K779S	TTACGAAGCCAGATCTTGACTGTGATGTC	30	K779T	TTACATAATCATGCATTTTATTAATTACA	30
K780	<i>tnaL</i>	K780S	CGTGAGCTGAGATCTAACCATCTCAACACA	30	K780T	TATGTAAGATATGCATAATGCATTAICTCT	30
K781	<i>torA</i>	K781S	CGATAAAGAAAGATCTGGTTCTTGCTGCC	30	K781T	GATCGTTATATGCATTAATTTTCTTCTCT	30
K782	<i>torC</i>	K782S	GTGCGTTGAAGATCTCGCGGAGGTGAT	30	K782T	TCCAGAGTTTATGCATAATAACCCCTTGT	30
K783	<i>tpiA</i>	K783S	CTAAAGGATGATGCATTTAAATCTCCACG	30	K783T	ATTTCTGTGCCAGATCTAGCAGTCCCGACAA	30
K784	<i>trcC</i>	K784S	GGGGAAGATGATGCATACGTATCTCTGTC	30	K784T	CCGCTGTACAAGATCTACCGCTTGTATGT	30
K786	<i>uhfBjfe</i>	K786S	CCGATCTCGCAGATCTAGTCCCGGAAAT	30	K786T	AGCTTAAGGTATGCATGCGCTTCTCTGTCT	30
K787	<i>uidA</i>	K787S	CTACAGGACGATGCATAAGGAGCTCTCTAT	30	K787T	TCACGTTTACAGATCTATCTGACCTACGGT	30
K790	<i>uxaA</i>	K790S	CTTTGATGTAATGCATATCAACCCAGACC	30	K790T	CAACCTGCTAGATCTAAATGCTGGGGCC	30
K791	<i>uxaB</i>	K791S	GATTGATGTATGCATAATGGGTCTCCTTC	30	K791T	GAATGGCGGAGATCTATTTGCTGTGCGAG	30
K792	<i>uxaC</i>	K792S	TCATAAACGAGATGCATTTTCGTCTCTCTCT	30	K792T	TCATATACCAAGATCTCCCTTAAATTTTAC	30
K794	<i>uxaB</i>	K794S	CAITGAAGATGATCTTGGATGGTTGATAC	30	K794T	CAACAATAGTATGCATCTGTAACCTCCAGAA	30
K795	<i>xyIA</i>	K795S	CAAAATAGGCATGCATATGAACCTCCATAA	30	K795T	CTTTTTTACAGATCTATCTCGATCTTTTT	30
K796	<i>xyIB</i>	K796S	CTATCCCGATATGCATATGCATGCTTCCTT	30	K796T	TTCTGTGACAGATCTCTGTGGCATGCGCA	30
K797	<i>xyIR</i>	K797S	GACGTTGCTGAGATCTGGCGAATGTTTAT	30	K797T	GACGTTTATGATGCATGGTCTTTTCTCTG	30
K798	<i>ynlVldgK</i>	K798S	TGTAGCGAGCATGCATGATTTCTCTTAA	30	K798T	TGATGAAATAGATCTTTATCGGGGGCGT	30
K800	<i>ynfE(dmsA)</i>	K800S	AAGGAGCTTAAATATCTAACTCTCAACTGC	30	K800T	GTTCAITTTTATGCATAACTACTCCCTGT	30
K801	<i>ynfF(dmsA)</i>	K801S	GAACTGGAAAAGATCTAAGTGATAAGCCCA	30	K801T	TATGGATTTTATGCATTACTACTTATGCG	30
K802	<i>zsf</i>	K802S	TTTGGCTTACATGCATGTCATCTCTTAA	30	K802T	GTGTCCATGCAGATCTAGAAACGATTAC	30
K803	<i>galR_2</i>	K803S	ATGAATTCTATGATCATTTACCCATATTCAA	30	K803T	ACATTTAACAAGATCTAAATGAGCGCGCG	30
K804	<i>exuT</i>	K804S	CATACAGGTTAGATCTACGATAGTCTCCG	30	K804T	CCCCGAACGTATGCATGAAGTTTGTGCTG	30
K805	<i>curA</i>	K805S	GATGTGTAAGAGATCTGGTCTTTTGATAT	30	K805T	CGCGTGACTTATGCATAACCCCTCAGAG	30
K806	<i>ycjL</i>	K806S	GAACTGAGAAGATCTCAAGGTACGATCC	30	K806T	CCATGCTCAAAATGCATAAAGTGGATAAAT	30
K807	<i>ycjK</i>	K807S	TGCAATCTGTATGCATACTAAATGTTTGTCT	30	K807T	CAACGCAACCAAGATCTGCCAACCAAGTTCT	30
K808	<i>argR</i>	K808S	GAGAGTCTGATGATCTAAGGCAGTTGGGTT	30	K808T	TAGCCGAGCTATGCATAAGTCAACCCGATAT	30
K809	<i>xyIR</i>	K809S	GTTGATAACGATGCATGCTGATTCCTTAT	30	K809T	AAACACAAGTAGATCTTGTCGGCTTTTTGA	30
K810	<i>ycjT</i>	K810S	GTTTACAGCAGATCTGTGATGAGCGGTGT	30	K810T	CAAAACCCCAATGCATTTCTAATTTGAAG	30
K811	<i>h2655/JW2631</i>	K811S	GACAGTTGCCAGATCTGACCAACATCGATAA	30	K811T	CACCTCTTTCATGCATGTATCTCGTATG	30
K812	<i>h0005/ynaxX</i>	K812S	GCAGCGGTGGAGATCTAAACCACGCAACG	30	K812T	ATTGCACTTATGCATAGGTTACTCTTTT	30
K813	<i>glnA</i>	K813S	CGTGTTCAGCATGCATCTTAACTCTCTCT	30	K813T	CAAACTGTGAGATCTATCAGCGGCTCTGT	30
K814	<i>ynlVldzP</i>	K814S	AGTCATTTTATGCATGAAACTTAAAGCCT	30	K814T	AGTTTCCGTTAGATCTAGACGCCCGCACCG	30
K815	<i>yciO</i>	K815S	CAGTGATAATATGCATATTTCAATTGCACA	30	K815T	CTGTTCCGCAAGATCTGCAAAACGAGCGGA	30
K816	<i>flu</i>	K816S	ATATTCGCGAAGATCTGGAGGCGGTATTCC	30	K816T	GTACGTATCTATGCATGTTACTGACAAAAG	30
K817	<i>b1742/32785</i>	K817S	TATCAAAAGTAATGCATACTCGCTCCCGGCC	30	K817T	ACCGCGCGCAAGATCTGACATATTGCCAG	30
K819	<i>ydeH</i>	K819S	TGTCTTCTTATGCATTGCCACTCTTTTT	30	K819T	CGATGATCGAAGATCTATGACCAATGATTT	30
K820	<i>ydeE</i>	K820S	TTAACCAGTTATGCATATTGCTCTCTCAAT	30	K820T	GGCGGTGTGGAGATCTGATCAAAAATGTG	30
K821	<i>yecI</i>	K821S	CTTGTGTCTAGATCTCCCATGCGGGATGT	30	K821T	TTCCAGCGGTATGCATACCTAATCTCTTA	30
K823	<i>srnB</i>	K823S	CCTGCTGATAAGATCTTGGGTACTGATGA	30	K823T	AAGTCGTACATGCATGTTCTTACTCTGTG	30
K824	<i>thrL</i>	K824S	AAGAGTTAGCAGATCTTGACGTTCTTACTG	30	K824T	TGCTAATGCGATGCATGGATGTTGTGTACT	30
K825	<i>thrA</i>	K825S	GGCAACGAGCAGATCTATTGCTGACGACTC	30	K825T	ACTTCAACATGCATGTTGTTACTCTGCT	30
K826	<i>thrB</i>	K826S	GCATGAGTTTATGCATCTGGCGACCACTGG	30	K826T	CATAAATTTTATGCATGTCAGACTCTCAAC	30
K827	<i>thrC</i>	K827S	TACGACAACGAGATCTCGTGTTTTCTCGGT	30	K827T	GATTTAGAGATGCATTTAGTTTTCAGTA	30
K828	<i>hetA</i>	K828S	TGTAGTCAAAATGCATATAAACTCTCTGTT	30	K828T	GTGCGTGAAGAGATCTTCGGGCCAGTGATG	30
K829	<i>hetB</i>	K829S	CTGCCATTGATGCATCAAGTCTCTCTCGGT	30	K829T	CTGGGCCAGAGATCTCATCAGCCGATGCT	30
K830	<i>yhbY</i>	K830S	CATGTGGGAAAGATCTTTAACGGTGAAT	30	K830T	AATTGAACATATGCATCACTTAACCGGAGA	30
K831	<i>yhbZ</i>	K831S	CAGGGCGCAGAGATCTCGCTTATCTGTGCT	30	K831T	CAATGACAATATGCATTAATCAITCTTTT	30
K832	<i>cysS</i>	K832S	GGCTTTCGCGAGATCTGTTGAGGAAGTCGT	30	K832T	TGAGAGATTTTATGCATCGAAGATTCGGTT	30
K833	<i>ybdL</i>	K833S	GGCATCAITTAAGATCTACGGAGAGCGGTGT	30	K833T	GAGGGGTAATATGCATTTTATGTGATCACT	30
K835	<i>serS</i>	K835S	GATCACCGGAGATCTAGGTGGCAATTGGG	30	K835T	GATTGGGATCATGCATGCTTATCTGTGCT	30
K836	<i>serC</i>	K836S	TCCAACATGAAGATCTTGAGTCTTTTATG	30	K836T	TGAAGATTGATGCATTTCCCTCACCAAG	30
K837	<i>aspC</i>	K837S	TAAITGTTCTCATGCATGACGAGGTTCCAIT	30	K837T	ACGGTGAACAGATCTCGCTACGCCGATCA	30
K838	<i>solA</i>	K838S	TGAGATCTGAATGCATTTTTCCTCTCTCG	30	K838T	TATAAICTTAGATCTAGAAAATTAATGCT	30
K839	<i>27384/ydc5(b1440)</i>	K839S	GGCAGGCATAAGATCTTATCTGCTCGCG	30	K839T	CAATGTCTTATGCATGAAGGTTCTTCTCT	30
K841	<i>27386/ydcU(b1442)</i>	K841S	CTCAAATTGCAGATCTAGATGAGCTGGAA	30	K841T	ATACATTCATATGCATTAACCTCTCTCAA	30
K842	<i>(proC)ydcV(b1443)</i>	K842S	AAGCCTATGCAGATCTGTATTGCTGGCAA	30	K842T	CGCGTTCAGATAGCATGCAACGCTCCGAGA	30
K843	<i>ydcW(b1444)</i>	K843S	ATTTCGCTGTAGATCTTGCTGCCATTCGG	30	K843T	GTAACCTTATGATGCATGATATCTCTGTA	30

K846	<i>theS</i>	K846S	GAGTTATAACATGCATTTTATATCTTATT	30	K846T	TCGCCCTATAAGATCTTGGAGGTTTGGAGG	30
K847	<i>IAID19ed0IdcyD</i>	K847S	CGCCCTTTTATGCAATTATGCTGATTATT	30	K847T	TAAACGTATATAGATCTGTGATTAACAGTG	30
K848	<i>yfbQ</i>	K848S	TAAGGGTCATAGATCTTTATCTGATGCAAA	30	K848T	TTTCAATGGGATGCATGAATCTTGACCTTT	30
K849	<i>cysK</i>	K849S	CCTGGTATCTAGATCTCGCAATTTGATTAC	30	K849T	CAAAAATCTTATGCATGGCCTTGCTTAAAC	30
K850	<i>cysM</i>	K850S	GTTCCTAATGATGATGATCTCTATCCATA	30	K850T	CGCTGACGGTAGATCTGCATGGCGAGCATG	30
K851	<i>gbyA</i>	K851S	TTTACGGCTTATGATCCGATCTCTCGTAC	30	K851T	TTGATGATCAGATCTGCATCTATAAAAA	30
K852	<i>posA</i>	K852S	TTACCGCTACAGATCTGAGATCAACGAATT	30	K852T	ATTTTGACAAATGCAATGATCTTCTCTCT	30
K853	<i>cysC</i>	K853S	CGTCATGCAGATGCATTTATTAACCCAG	30	K853T	CGGAGAAAGCGAGATCTCTGGTCTGACCGA	30
K854	<i>cysN</i>	K854S	CAAGTGGCGTATGCATCTAAAAATACCCC	30	K854T	TCGGTGGTGCAGATCTTGACGAAGAGAAAT	30
K855	<i>cysD</i>	K855S	GTCTGATTTGATGCATAACCGTTCTTTGG	30	K855T	CGATTATCGCAGATCTTAATAATATACCGA	30
K856	<i>cysH</i>	K856S	GATCGAGTTTATGCATAGATCTCTCACTGT	30	K856T	CACGCCGAGAGATCTCAACTCGATGGCTTG	30
K857	<i>cysI</i>	K857S	GATGTTTTTCTATGCATAGTAGACATCTCG	30	K857T	CGTGGAGAAAGATCTGAAGTCCGGTATT	30
K858	<i>cysJ</i>	K858S	GGACCTGTGTATGCATGCGTCTGTATGTTCT	30	K858T	CTCTAGGTTAGATCTAACCGCCGCTTTAG	30
K859	<i>gcvP</i>	K859S	TTAAGCTCTGATGCATGAGCGATGGTCTCT	30	K859T	ATTGATTGATAGATCTGTACACAGCAGAAC	30
K860	<i>serA</i>	K860S	GCATACCTTATGCATTTACCCAATCTCTGT	30	K860T	GAAGTTATCCAGATCTCAGTGATGCAGTG	30
K861	<i>metC</i>	K861S	TGAGCAAAATGATGATCTTAAGCTTTTGCTAC	30	K861T	GCTTTTGTGATGCATGTGGGAGATCTCTGT	30
K862	<i>yhaPtdcG</i>	K862S	CGTTGTAACTCATGCAATTTTCAGCAGTTTAC	30	K862T	TTTCAAAATAGATCTGTGTCCTCTCAGTTC	30
K863	<i>yhaQ</i>	K863S	CACATAATCATGATCACTCGGATGTGCC	30	K863T	GAACACGACAGATCTTATTTACCTGAC	30
K864	<i>yhaD</i>	K864S	GATTGCAATAATGATCTCGGGCAGCAGCTC	30	K864T	GACGGTACGAGATCTTGATGGTGGGGCGC	30
K865	<i>yhaE</i>	K865S	TAGTCATATCATGCATCTCTTGTGTGGCG	30	K865T	AGGCCATCTCAGATCTGCATCACACCCGGA	30
K866	<i>yhaFgruL</i>	K866S	AAACATCGTATGCATCGTATCACTCTTG	30	K866T	CAGGAAAAAGAGATCTGATTTGAAAGTG	30
K867	<i>yhaUgruP</i>	K867S	CGGTGTCCAGATGCATTTTATTAACCTTGG	30	K867T	GTTCAATTAAAGATCTCCATCCGGGAAAC	30
K868	<i>asd</i>	K868S	AACCAACATTATGCATAAGCGTTTTTTTCC	30	K868T	CACGATAAATAGATCTCACTCCGGGAGAT	30
K869	<i>gbyS</i>	K869S	AAGTTTTTCTCATGATAGCCGCTCTTACT	30	K869T	TGGCTGAACGAGATCTAAGTGACCGAGTTC	30
K870	<i>gbyQ</i>	K870S	TATCAAAATGATGCATATTATTTGCTGTGCT	30	K870T	CGCGACTGGAAGATCTTGAGTTTATCACT	30
K871	<i>cysE</i>	K871S	GTCTTCCACAATGCATGTCTACTCCACAC	30	K871T	AAAACGTTATAGATCTGGTGGCGGGAGTG	30
K872	<i>kbl</i>	K872S	AAAATCTCCATGCATCTCGATCTCCAGA	30	K872T	GTTCACAGCAAGATCTGAAAGATTTCTATA	30
K873	<i>ilvD</i>	K873S	GGTGGTAGCAGATCTCGCCGCCACGGTTA	30	K873T	GCCATTATCATGCATGAGTGGTGGGGTG	30
K874	<i>ilvY</i>	K874S	GATCGCGTAATGATCAATGGGACAGCCCTCG	30	K874T	TCATCAGTGGAGATCTGGTGGCGACTACAT	30
K875	<i>metL</i>	K875S	GGACGTTGTACAGATCTCTGGCTGGTGGCG	30	K875T	CGCGAATCAGATCATTTTACCCTTGTTG	30
K876	<i>lysC</i>	K876S	CAACAATTTATGCATAAATCACTCGTGTCT	30	K876T	CTCTCTGATAGATCTAATGTGTGACTTTGG	30
K877	<i>serB</i>	K877S	TCGGTTTTAAGATCTAATGGCTCGACAAT	30	K877T	AGGTAATGTTATGCATTAAGGCTCTGTAA	30
K878	<i>cysM</i>	K878S	GTTCCTAATGATGCATGATCTCTATCCATA	30	K878T	CGCTGACGGTAGATCTGCATGGCAGCATG	30
K879	<i>cysA</i>	K879S	CAATCTCAATATGCATGATGTTCTCTCTCG	30	K879T	CCGGTCTGGTAGATCTGCTGTCTACGGAT	30
K880	<i>cysW</i>	K880S	CCGGCCAGGAATGCATAATTTGACGTTAT	30	K880T	TGCTTCGGTGAAGATCTGCGGATCTCTCTGT	30
K881	<i>cysU</i>	K881S	GGAGCAGCAATGCATAGTTACGCCCGGCC	30	K881T	CGCAGCGGATAGATCTGACGGTGGTGACAA	30
K882	<i>yidK</i>	K882S	ATATTCAGTAGATCTTTCACGGATCAGCTA	30	K882T	AAAGGGTTCGGATGCAATTTGTTATCTCTCT	30
K883	<i>ylfD</i>	K883S	GCAAAACCGGATGCATCAGCGGTGGCATGT	30	K883T	AGCGTTTCTTAGATCTTATCCCGCAGGA	30
K884	<i>ybfZ</i>	K884S	TCTGCAAGGCAGATCTGTGATGGCCGCACA	30	K884T	CGAGCAAGGATGCATGTGCGAGCTCTCTGG	30
K885	<i>macA0878/21383</i>	K885S	CTTCGCCAGTAGATCTCCGGGGGTATTCAA	30	K885T	ATACTCCATAATGCATCCCGGTCTTAAC	30
K886	<i>cysC</i>	K886S	GTAGCAAAAGCATGCATTTAAATCTCTCTCT	30	K886T	ACCAAGTTAGAAGATCTTCTGCTGACTGGATG	30
K887	<i>metB</i>	K887S	ATTTCTGTCGAGATCTCTTACGAGCATCTG	30	K887T	CCTGTTTACGATGCATGTGATGAAGTTCCC	30
K888	<i>betL</i>	K888S	TCCCCAATTTATGCAATTTTCGCCACTCCAT	30	K888T	GTCCCGCCGCGAGATCTCGGCTGCATATACT	30
M001	<i>deuD</i>	M001S	CGATGCATGTAGTACGTGTGCCCTAAAATTAATG	34	M001T	GAAGATCTCTTTATCTCCGGCAGCAAGAAG	29
M002	<i>rnc</i>	M002S	CGATGCATGCATACCAATAAATAATGCGTCT	32	M002T	GAAGATCTCAGGTGGGGATGATTTACCAG	29
M003	<i>rut</i>	M003S	GAAGATCTACTGGGGCGTGGATAAATACG	29	M003T	CGATGCATCTGATTTCTTAATACGGATAAATG	34
M004	<i>rho</i>	M004S	GAAATGATCTCGTGCAAAATGATCGCCCC	28	M004T	CGATGCATAGTGGTGTGAGTTCTTAAACTTG	31
M005	<i>rtcB</i>	M005S	CGATGCATTTGTTTGTCTTTTCTTTTCTGTTTGG	34	M005T	GAAGATCTCAACGCTACCACTTCCTGTTTC	31
M006	<i>hbgG</i>	M006S	CGATGCATAGCAAGGACCTTTTATATAACAAAAAACC	38	M006T	GAAGATCTCGTACTTACTGCGCTGTCTGTG	29
M008	<i>rna</i>	M008S	CGATG CATAATGGGTGTGGAACCTACATAC	32	M008T	GAAGATCTGTGTGATGGCTACCGCGCTG	29
M009	<i>rnh</i>	M009S	CGATGCATAATTGTCTATTTTGGTGCCATTAG	33	M009T	GAAGATCTCGGCTACTGTTTGTCTGATG	28
M010	<i>rne</i>	M010S	CGATGCATCTGAATCTACTCATTTTCTTACATTG	35	M010T	GAAGATCTGTGGCGAAACCGGCTCTCTC	31
M011	<i>lhr</i>	M011S	GAAGATCTGTAAACCGGCTATATGGTGG	29	M011T	CGATGCATTAACGCTATTTCCCGTGAATATC	28
M012	<i>msaA</i>	M012S	GAAATGATCTGCTGGATTTTCCGCTCTCAC	32	M012T	CGATGCATCGCGGGCTTTTCACTTC	25
M013	<i>rnd</i>	M013S	CGATGCATCAAAATGTTTCTTCTTAGTGGGC	28	M013T	GAAGATCTGATCTGCGCGATTGTGCTATC	29
M014	<i>rnhA</i>	M014S	CGATGCATCTCTGTAGATCTCTCTGTAATTGAAT	34	M014T	GAAGATCTGCGTTATGGATACCAACTCTC	29
M015	<i>rrn(vacB)</i>	M015S	GAAGATCTCGACACAGCTTGTGGCTGTTT	29	M015T	CGATGCATCTCGGTCTCTCCGTTGTCTCAT	30
M016	<i>gpi</i>	M016S	CGATGCAT ATTGAATCTCGGCTTGAAACAAATG	35	M016T	GAAGATCTTTCAGCGGCAATGGCTCAAG	29
M017	<i>orn</i>	M017S	GAAGATCTCAAAATGCAATCTGGTCAAGTTGG	33	M017T	CGATGCATGCTATTTTCCACCTACACAGTG	32
M018	<i>rnhB</i>	M018S	GAAGATCTGTGTCTGCTGCATTTCTGCCTT	28	M018T	CGATGCATTTGTCTAACTCAGAACGGCTT	30
M019	<i>hspB</i>	M019S	GAAATGATCGAGGCGGTAAAGGGTGAATCT	29	M019T	CGATGCATAAAACGCTCCAGAGGGTATAACATTC	33
M020	<i>hspA</i>	M020S	GAAGATCTCAGACTCTCCGGACGGTCTT	28	M020T	CGATGCATAACGTTAGTGGCGAGTATGCTG	30
M021	<i>usr</i>	M021S	GAAGATCT ACCTGGGTGGTGTTTTCTGG	29	M021T	CGATGCATGTGATACCTCAATTTGTTTTTCAATTAAC	32
M026	<i>dsrA</i>	M026S	GGAATCTCTCAATCACTTATCCGCAATTTTTTTCG	34	M026T	GAAGATCTGGCAATCAGCGGTAAACCTTG	29
M031	<i>greA</i>	M031S	CGATGCATTTGTATATACTCTGTAATATCTGATAG	37	M031T	GAAGATCTGCGGTTTTTCCACATTTGCTTGT	30
M032	<i>greB</i>	M032S	GAAATGATCTACGATACGGTCCACTTCTTCC	30	M032T	CGATGCAT CTCGTGATTCCTTTGTCTGTTTGTG	32
M041	<i>msaB</i>	M041S	GAAATGATCTATCACTCGCGGCTTTCAC	29	M041T	CGATGCATGGATTTCCCTCTACTAATTTCAAG	33
M044	<i>oxyS</i>	M044S	GAAATGATCGGCTGCCATCTTTAAGGAC	30	M044T	GGAATTTCTGTGAGCAATTAAGTACAGATGC	32
M045	<i>pth</i>	M045S	CGATGCATGTTTTTTTGTCTGAGTGTGATCAATAC	36	M045T	GAAGATCTACGTTTGTCTATAGTGGCAACC	30
M047	<i>rhfA</i>	M047S	CGATGCATAATAAATCTCTGACAAAAAGGGGC	35	M047T	GAAGATCTATTGAAGCGGAAAGCTGGATC	30
M049	<i>relB</i>	M049S	CGATGCATGTTCTTACCACTCTTGTAATACAAATGTC	35	M049T	GAAGATCTTCAGATGTTTCTCTCGCGGG	29
M050	<i>rhfB</i>	M050S	CGATGCAT AGTGTGGTAGAATATCAGCTTACTATTG	36	M050T	GAAGATCTGGGCACCGCAACATGAAATTC	29
M059	<i>rhoB</i>	M059S	GAAATGATCTGGGAAGCTGTGCTGGTGTG	29	M059T	CGATGCATTAGCTTTGTCTCTGGATGTTTGC	32
M061	<i>rhoD</i>	M061S	GAAGATCTGCCCTTCAATGAGTGTGACG	29	M061T	CGATGCATTGCTCTCACTTTGATTAATTC	31
M062	<i>rhoE</i>	M062S	CGATGCAT CCGAGGTAAAGTCTCCCAAAACC	30	M062T	GAAGATCTGGGCTTTACTTAGAACGATGAC	31
M063	<i>rhoH</i>	M063S	CGATGCAT TCAAATCTCTCAATCGATATCTCTG	35	M063T	GAAGATCTAACTGATGGTGGCAGAGATGG	30
M064	<i>rhoN</i>	M064S	GAAGATCTCAGGAAGCTTCAATTTCCGT	29	M064T	CGATGCATGGTTCAGAAATCGTACTCTCTGTC	30
M066	<i>rrsA(rrkA)</i>	M066S	GGAATCTAAAAAGTTTGACGCTCAAAGAAATAAACCCTC	38	M066T	GAAGATCTTGCGCAAGAGAGTTGTCTATACCG	39
M076	<i>rtcR</i>	M076S	GGAATCTAAGTTTTTACGGCAGGTCTTCC	29	M076T	CGATGCATCTTAGATATCTTATAAAGACGATATTCTA	31
M079	<i>sarA</i>	M079S	GAAGATCT AAGAGTCTGAAAGCGGAGCTTG	29	M079T	GGAATCTCGAATGGGATGGCAACATTTGTG	30
M090	<i>ycgI</i>	M090S	GAAATCTAGAAGGACGGAGTGTAGTATTGTC	31	M090T	CGATGCATAAGCTAACTAATGAACCCCGG	32
N001	<i>otsA</i>	N001S	CGATGCATAGTCTATCACTCTGTATTTCTCT	32	N001T	TCAGATCTGGCCACAAATGGCG	22
N002	<i>otsB</i>	N002S	CGATGCATCCGGTTCTCTCTCTCTCTTTTC	31	N002T	GAAGATCTGACGTGATGTTGTTATGAGTGC	30
N003	<i>aldB</i>	N003S	CGATGCATGATGCTCTCTCTGCGGTG	26	N003T	GAAGATCTGTAAAAACGACGCGGAGGATGC	28
N004	<i>appY</i>	N004S	GAAATGCTGTTGATGTTATGCTTTTTCGCGCCC	32	N004T	CGATGCATCTTGCACTATCAATAAATAAAAAAAG	36
N005	<i>cfxI</i>	N005S	GAAATGCTGCAAGTCTGGTGGTTTCTGGC	30	N005T	CGATGCATAGTTTCTTCACTACTGGTCTG	28
N006	<i>cxgB</i>	N006S	GAAATCTAAACGTTCTTGTTTTTCTCCACACC	34	N006T	CGATGCATGTTGTACCTCTGGACCTG	26
N007	<i>larE</i>	N007S	CGATGCATAAACATCTCTGATAGAGTTAATAAAAAC	37	N007T	GAAGATCTGCAACGGTAAATGACCTCTCGG	30
N008	<i>gfpS</i>	N008S	CGATGCATAGGACATCTCCGGTTATC	28	N008T	GAAGATCTGAGCATGTGACCGAGATAAGC	30
N009	<i>thfA</i>	N009S	CGATGCATAGGTTCAATCCCTCAATGATGC	30	N009T	GAAGATCTCGAAGAGCATCTGGAACCTGG	28
N010	<i>osmC</i>	N010S	GAAATCTCAACATAGTATCTCCGTTGCTGTG	33	N010T	CGATGCATTGTTGCTCTCTCTGGGCGC	26
N011	<i>osmE</i>	N011S	CGATGCATATCTCGTCTCTCTGTTTATCAGC	31	N011T	GAAGATCTCGGATAAGTTTGCAGGTAGCTTTTC	33
N012	<i>posB</i>	N012S	CGATGCATGGTTCTCCATCTCTGATG	28	N012T	GAAGATCTCCGGCAGGAAATTTTACGCC	29
N013	<i>proP</i>	N013S	GAAATGATCTGTTGTTGCTGGGTGATTTGCTCG	31	N013T	CGATGCATAGCTTTCTCTCGCAGATGTG	27

N014	<i>proV</i>	N0148	GAAGATCTGTGGGCTGACGATGTGAAAGC	29	N014T	CGATGCATGCAATAGAAAGATCTCTTATTTGTCTATG	38
N015	<i>roh</i>	N0158	CGATGCATAAAATATCCTCATCTTCAACAACG	34	N015T	GAAGATCTCAATCCCTCTTATACCAACG	30
N016	<i>rpoS</i>	N0168	CGATGCATAAGGTGGCTCTTACCCG	25	N016T	GAAGATCTCTGGATTACTGGCAACGATTTC	31
N017	<i>sodC</i>	N0178	CGATGCATAGGACCTCCGTCATTGTG	27	N017T	GAAGATCTCTCGACCACTACAACAACATGC	30
N018	<i>treA</i>	N0188	CGATGCATCAATCATCTCTCTTGGCGAAAC	31	N018T	GAAGATCTCGGATACCAACCAAGAGAAACG	30
N019	<i>zthA</i>	N0198	GAAGATCTGCATTAAAGTGCATATAAAGTAATCG	37	N019T	ACATGCATGCAATGCGTCCATTATTCAGATAAAG	34
N021	<i>ftsQ</i>	N0218	GAAGATCTGGGCTTTCAGAAAGTGTTCGCG	32	N021T	CGATGCATATAGTCGCGCAGTTCGAG	27
N022	<i>hdeA</i>	N0228	ACATGCATGCATGTAATATCTCAACTATAAAGTGAAAG	40	N022T	GAAGATCTCCAGAGACGAACGGGAACTG	29
N023	<i>osmB</i>	N0238	CGATGCATAATCTCTCTCTGAATTGATTCAC	36	N023T	GAAGATCTGAAAAAGCGGAATGATGTTGCC	34
N024	<i>adhE</i>	N0248	CGATGCATAATGCTCTCTCTGATAATGTAAAC	32	N024T	GAAGATCTTAGTTTTGTTTTCGCGCTGCCG	29
N025	<i>clpA</i>	N0258	GAAGATCTGCACAAAGGGCAGGTATGAATC	29	N025T	CGATGCATAGGACCTCCCTCAATTTTATG	31
N026	<i>gndA</i>	N0268	CGATGCATTTCGAACCTCTTAAATTATTTGAAGG	35	N026T	GAAGATCTAATTGCGTCAGAAAGTACCCGG	30
N027	<i>gndB</i>	N0278	CGATGCATTTAAACTCTTAAATGATGGATCG	35	N027T	GAAGATCTGCCAAAATAATAACAGCCCCGTC	31
N028	<i>glpD</i>	N0288	GAAGATCTTATAGACACATAGTAGCCCTG	30	N028T	CGATGCATGCTGCCCTTACTCCTTTT	27
N029	<i>hlpA</i>	N0298	GAAGATCTCCGATCAGGCCAGTAATTATG	30	N029T	CGATGCATAATAAATCTTACCATTCCATTGCG	34
N031	<i>modA</i>	N0318	GAAGATCTAAACGCAAGCCACGCAAAAGC	29	N031T	CGATGCATTGGTAAACCCCTTAATGTACAG	29
N032	<i>ompC</i>	N0328	CGATGCATGTATTAATCACTCTGTTATATGCC	32	N032T	GAAGATCTGAAGCATCCGGTGTAAATAGG	29
N033	<i>ompX</i>	N0338	GAAGATCTCAGCGTCTCTAATGCCAGACG	29	N033T	CGATGCATAAACCTCAAAATGTGATTCAAATAAG	35
N034	<i>pupA</i>	N0348	GAGGATCCCCCGCTTCGTGACCAAAACAG	28	N034T	CGATGCATAATGTGTCCTCTTGATTTCTGC	31
N035	<i>slp</i>	N0358	GAAGATCTCTTACGACACTCTCCGATAC	30	N035T	CGATGCATGTTACTTCTTATCAACAATATTAACAC	38
N036	<i>ssxA</i>	N0368	GAAGATCTCGGAAATCTCAACGTAAAGGC	32	N036T	CGATGCATGATTACACTCCACCGCG	25
N037	<i>trfF</i>	N0378	GAAGATCTGGCTGTGTTACTGCGTTTATATC	32	N037T	CGATGCATAAGGATCCAACTCCGAAATTC	30
N038	<i>uspB</i>	N0388	CGATGCATACTCTCCCGCGGACCC	26	N038T	GAAGATCTCCGGTGTATAGGTACAGATGAG	29
N039	<i>acpA</i>	N0398	GAAGATCTTGATGCGCATATATAGGTTAGC	32	N039T	CGATGCATAGCTCTCTCTTAATGACAGG	28
N040	<i>cspD</i>	N0408	CGATGCATGCTTCGACATCTCTCGC	25	N040T	GAAGATCTCAGCTCAATAACAACCTCATCGG	32
N041	<i>galE</i>	N0418	CGATGCATAATTGCTCTCACTAGGCTTATGG	31	N041T	GAAGATCTGTGTTGTTGTCGCCACCGCTG	29
N042	<i>galY</i>	N0428	CGATGCATACTCTGCTGTTGTTTTCGATTTC	32	N042T	GAAGATCTGCGTGAAACTGATTAAACGCGG	29
N043	<i>glgC</i>	N0438	CGATGCATGACTAACTCTTTTTTATCATCTCTG	34	N043T	GAAGATCTTTAATCTCGTCACCGCGCATG	29
N044	<i>hns</i>	N0448	CGATGCAT TGTAGTAATCTCAAACTATATGGGG	35	N044T	GAAGATCTGGGGTATATGCGTTCTCCCTTAC	32
N045	<i>hyaA</i>	N0458	GAAGATCTCATTAAGCAAAATACGCCCTGAG	33	N045T	CGATGCATACGCAAGCTCTCTCTCC	26
N046	<i>rbsB</i>	N0468	GAAGATCTCCGATCTGTTTGGCTGGTTGG	30	N046T	CGATGCATATTCAGATGTCTCTGATGTG	29
N047	<i>rbsD</i>	N0478	GAAGATCTTATGTCATGAGCGGGTCGATTC	30	N047T	CGATGCATTTTTTCTCCATCAGCGAAAGC	30
N048	<i>shyD</i>	N0488	CGATGCATGATATCTCTTGAGCATGGG	27	N048T	GAAGATCTCATGCCGATACCGGTACAATTTC	31
N049	<i>shpA</i>	N0498	CGATGCAT AATAAGAAAACTTTTAACGCCAAAAAC	36	N049T	GAAGATCTTAAATCAATTAGATATGGCTTACCC	33
N050	<i>wrbA</i>	N0508	CGATGCATTCTAACCACCTCTCTGTTTATC	31	N050T	GAAGATCTTTTTGCGGTGATGCTCTTACAC	32
N052	<i>ahpC</i>	N0528	GAAGATCTCATTAATTGTCTCTTTTACGTGTC	35	N052T	CGATGCATCTAATCTCTCTCTGTTGTTTC	29
N053	<i>cpuP</i>	N0538	GAAGATCTGTTTGGCTGTGCTGCTGCTC	28	N053T	CGATGCATCAATTTGCTCCCAAACTCTCTG	31
N054	<i>csiE</i>	N0548	GAAGATCTTCCCGCTTTTACTCAATCCAGC	29	N054T	CGATGCATAATTGATAAGAAATAGCTAAAGTTGCTC	36
N055	<i>cspC</i>	N0558	CGATGCATTGAAAAATCTTAGATTGTTTCTCTG	37	N055T	GAAGATCTGTTTAAAGTATGCTGCTGAATGCC	32
N056	<i>cspE</i>	N0568	GAAGATCTATGGGAAAGTACTTGCGCAC	28	N056T	CGATGCATCAAAATACCTTTACATGAAAAATAGACAC	38
N057	<i>gabP</i>	N0578	GAAGATCTTAAAGACGGAATGCTGGCGATAG	30	N057T	CGATGCATCTGAATCTCTCGAAAGTG	28
N058	<i>gor</i>	N0588	GAAGATCTGTGCGGTGTGCAAAAAGCC	28	N058T	CGATGCATGACAAAGTGTCTTATGTTG	29
N059	<i>guaB</i>	N0598	CGATGCATGGCGAATATCTCGACAG	26	N059T	GAAGATCTGGCGGTGTGCTGTTTGAGTG	28
N060	<i>hutG</i>	N0608	GAGGATCCGAGTTACGCGATTGCCATACG	30	N060T	CGATGCATCAATGTGCTCCCTCTAC	26
N061	<i>oxyR</i>	N0618	GAAGATCTGTCAGGTGATTGACGAAGATGTC	31	N061T	CGATGCATTAATCATCTCCATCCGCC	26
N062	<i>pcm</i>	N0628	CGATGCATTGCGTGCCCACTCCAC	25	N062T	GAAGATCTGTGAATGCTCTGATGCGTCC	28
N064	<i>leuA</i>	N0648	CGATGCATGGTTTGGGCTCTGTCTCTTTTAG	32	N064T	GAAGATCT GCATTAATCTTAACATTAATGATCAATAATTCAC	46
N065	<i>phoH</i>	N0658	CGGGATCCGTACAAAAAGGCTCAATGGCGAAG	33	N065T	CGATGCATCAACCGGATCTCCATAGTGAC	30
N066	<i>ldhA</i>	N0668	CGATGCATCAAGAACTTCTCCAGTGAATGTGAATC	37	N066T	GAAGATCTCAATTTCCGAGACAAGCAAGATC	32
N067	<i>ldhA</i>	N0678	CGATGCATCATATAAACTCTGTGAACCTTCAG	33	N067T	GAAGATCTGAATGATTTGATACGGTCCGCC	30
N068	<i>rraD</i>	N0688	CGATGCATCATGATGCTCCATATTTTAAGAACAG	36	N068T	GAAGATCT CGAAGAAGCTCACCACAACC	29
N069	<i>tag</i>	N0698	GAAGATCT CGTAATGTAATGCCGCGACCG	29	N069T	CGATGCATCAATTTCCCTCGTATGTACC	31
N070	<i>msyB</i>	N0708	CGATGCATCATCAAGTATCTCCCTTTGAGTTG	32	N070T	GAAGATCTGAATCGCGGGTAAACGTACG	28
N071	<i>metE</i>	N0718	GAAGATCTGCTATGGCACTCAATGGCAATG	30	N071T	CGATGCATCAATTTTCTCTCTTAATTAATGTAATCTTATG	44
N072	<i>metK</i>	N0728	GAAGATCTATCTCTGAGAAGCGCCGAGATG	29	N072T	CGATGCATCATATTTAATATACCTTAAGAGAAATTTGGTTAG	42
N073	<i>cysA</i>	N0738	CGATGCATCAATTAACGACCTCAATCCACCG	32	N073T	GAAGATCTCGTCTTGGTGGTTTGGCTGG	28
N074	<i>purB</i>	N0748	CGATGCATCATAGATCAACACTCCGGGG	28	N074T	GAAGATCTTGTGATGCGGATGCGCTACAC	29
N075	<i>purF</i>	N0758	CGATGCATCATAGCTCTTTTCTCGTTAAAGCC	33	N075T	GAAGATCTGACAGGCGTAAATCTGGGG	29
N076	<i>purT</i>	N0768	GAAGATCTGCTGGTTCTATTAATGGCAGCG	30	N076T	CGATGCATCAATAAGCAATATCCCTGATTAATTC	35
N077	<i>entB</i>	N0778	GAAGATCTTATGGGTTGCGGATGCCGAG	29	N077T	CGATGCATCAATGTTCTCTCTCTTCAGCG	30
N078	<i>nmpC</i>	N0788	CGATGCATCATGCTGAGGCCCTTTTTTGAACTATT	35	N078T	CGGGATCCATTTCATAACCCCACCTCCGAG	31
N079	<i>relB</i>	N0798	CGATGCATCATGCTCTTCACTCTTGTAATTACAAATG	38	N079T	GAAGATCTTAATCTGATGTTCTCTCGGGG	30
N080	<i>fixA</i>	N0808	GAAGATCTAAGCCAAAGATATGCCAGC	30	N080T	CGATGCATCATATCGTGGTGTTAATACAGATATC	36
N081	<i>hepA</i>	N0818	CGATGCATATGTTTGGGCTCTATATCTTTAATG	35	N081T	GAAGATCT CATCTCCGCAACGAGGCCATATC	31
N082	<i>marR/marA</i>	N0828	GAAGATCT GGGAAATCGAAATGCCAAATGATTC	33	N082T	CGATGCATAGGATTAAGCGACCCAATGG	29
N084	<i>ompG</i>	N0848	GAAGATCT CTGAACACCAACATGATCTACG	30	N084T	CGATGCATTAATGTTCTCTGTTATATCTGGG	32
N085	<i>cspA</i>	N0858	GAAGATCT CTGTACGAAATTTGAGCAGTTACG	32	N085T	CGATGCATAGTGTATACCTTTAATAATTAAGTGTGTC	37
N086	<i>sfnA</i>	N0868	GAAGATCT GAGCAACTTCAGAGCGCAC	28	N086T	CGATGCATATATATCTCTCAATCTAATTATGAC	36
N087	<i>sfnC</i>	N0878	GAAGATCT GACTGCGATCTGTGTTGCCC	29	N087T	CGATGCATAGTTAATACGCTTGTGTATTC	31
N088	<i>acs</i>	N0888	CGATGCATACAAAACTCTTCAAATTACGTCAATG	37	N088T	GAAGATCT CACAGGTAAACGATAGGCAATAGT	32
N089	<i>acrR</i>	N0898	CGATGCATATGTTCTGTAATTTACAGCGGTAG	28	N089T	GAAGATCT CCGAGTTAACCGCAGCATTC	33
N090	<i>fruB</i>	N0908	CGATGCATAGTTCTCTCTCTCTGCTGAATTG	31	N090T	GAAGATCTTGATGCTGGTGGATCACTGG	29
N091	<i>entC</i>	N0918	GAAGATCT GGAGCATCAATGCCAGCAG	28	N091T	CGATGCATCAATCTCCACAAATGATAAAGG	33
N092	<i>yycF-purB</i>	N0928	CGATGCATGTTCACTGCTCTCTGTTTAAAG	31	N092T	GAAGATCT CGTAATTCGCGGATGTTCTGG	30
N093	<i>cspA-purF</i>	N0938	CGATGCATATGTTCCCAAGATTTCACG	29	N093T	GAAGATCT GCGCTGAAAAATGCCGATAAAGTG	32
N094	<i>csiD</i>	N0948	GAAGATCTGGAGAACCGCGCAATCATCTC	29	N094T	CGATGCATCAGAAGCATCTCTCTTATGAG	29
N096	<i>hdeB</i>	N0968	CGATGCATTTTGTAACCCATTCAATATAGAGATTATATG	41	N096T	GAAGATCTAGTTGCGAAATTGATTCGTGACGG	32
N097	<i>hdeD</i>	N0978	GAAGATCTATCTCGAGTACAGGCTGAACG	30	N097T	ACATGCATGCAATGACCAACCTTATAAATTAAGAAAG	37
N098	<i>nlpD</i>	N0988	CGATGCATTTATCCCCAGGAAAAATTGG	29	N098T	GAAGATCTTGGCGATGGATGGCAAGGTTG	30
N099	<i>sodA</i>	N0998	GAAGATCTGCGCGATCAATGCCAAAATATCC	32	N099T	CGATGCATATCTCTCCAGTATTGTCCG	29
N100	<i>sodB</i>	N1008	GAAGATCTGCAAAAAGCTACGAAAGTGGCAATG	33	N100T	CGATGCATGCTACTCTCTCTTATATTAATTTC	35
N101	<i>yhgS</i>	N1018	CGATGCATAGGATGCTCTGTTATGGTC	28	N101T	GAGGATCTTTTGGCGGACAGGATCATG	29
N102	<i>yycF</i>	N1028	CGATGCATATTTTCTCCAGTGAATCACTGC	32	N102T	GAAGATCTACGTCAATTTTCCCGCCAACG	31
N103	<i>yycI</i>	N1038	CGATGCATGTTTATTTCTCCGTTGCGTTG	29	N103T	GAAGATCTGGATCAGGTAAAGCAGCGAATG	30
N104	<i>yjhJ</i>	N1048	GAAGATCTGTGGGGATCGTAGCGTTAC	28	N104T	CGATGCATAATCAAGACCTCATCGTAGG	29
N105	<i>yjhH</i>	N1058	GAAGATCTGTGATTTCAGCACTTTCGGG	29	N105T	CGATGCATCACTCGAATCTCTCTCTTC	27
N107	<i>yycZ</i>	N1078	GAAGATCTGCCGATATATCTTTAACCTGTTC	34	N107T	ACATGCATGATGCTACGCCCTCTGTTAAAAATG	33
N108	<i>yggU</i>	N1088	CGATGCATAGCTACTCATCTGTTAAACGG	29	N108T	GAAGATCTCGTTTAGGCTGGCTCATTCG	28
N109	<i>yiaG</i>	N1098	GAAGATCTCAACCCACTCAGGCTCACTAC	29	N109T	CGATGCATTGAAAACTCTCAATCACACTG	31
N110	<i>yycE</i>	N1108	GAAGATCTTCGAAGTGAAGCGCTGATGGG	30	N110T	CGATGCATCTGCAAGCTCTCAATTC	26
N111	<i>fixA</i>	N1118	GAAGATCTTGTGTTGACATGTGAACCTCTTTTCAAG	37	N111T	CGATGCATAGGTTTCTCTGTTAATAGCAGC	30
N112	<i>galM</i>	N1128	CGATGCATTGTCTGCTCTGTGATG	27	N112T	GAAGATCTCTGGTGGCAGCAATACACAC	31
N113	<i>hspG</i>	N1138	GAAGATCTAGTGATCTCGCCACCAACC	28	N113T	CGATGCATGTAGGTCTACTCTCAATATGCC	30
N114	<i>hspW(hspA)</i>	N1148	GAAGATCTCTGCTCAGAGCGAAATAACCC	29	N114T	CGATGCATCGCGAGCGCTTATCG	23

N115	<i>clpP</i>	N115S	GAAGATCTTGTTGCTCTGGAAGAACAGGCTG	31	N115T	CGATGCATTCCGTCCTCTGGATAAAATTG	30
N116	<i>phsA</i>	N116S	GAAGATCTGCATGAATAAATCTACTGCTGAGTTG	35	N116T	CGATGCATTTTATTTTCTCCATGACAAATAC	32
N117	<i>auxA</i>	N117S	GAAGATCTCTGGTTGAACCGTGTGTTATTTGGG	33	N117T	CGATGCATGATTTTCTCTTCACATAGTGG	32
N118	<i>ycsP</i>	N118S	CGATGCATCATGGCCCCCTAATTCGTG	27	N118T	GAAGATCTGAAGTCACCATAGCGAAACTTCTC	33
N119	<i>livK</i>	N119S	CGATGCATAGTCAAAAATCCCCATTCGTG	29	N119T	GAAGATCTGTAAACGAGGAAGGGGAATCTC	30
N120	<i>rpmE</i>	N120S	GAAGATCTAGTAAATCGCAAGGCATGAACAG	34	N120T	CGATGCATGGGAAACCTCGGTTTAAGG	28
N121	<i>lon</i>	N121S	GAAGATCTTTAATCTGGAAGCGTGGATCTG	31	N121T	CGATGCATAGAGCTCTCTCTAGTTTAAATTC	32
N123	<i>hscB</i>	N123S	CGATGCATAACATCTCAGGGCTCGG	26	N123T	AAGATCTATACCTTTCTGGCTAACCCGG	29
N124	<i>gst</i>	N124S	CGATGCATCGTTATCTCCAGAGATTAAGG	30	N124T	GAAGATCTCGTTTCTCTCTCCCGCAG	27
N125	<i>metA</i>	N125S	GAAGATCTTGTCAGTTCCGGTGCCATC	27	N125T	CGATGCATAACCTGATTAACCTCCTACATAC	31
N126	<i>hflq</i>	N126S	GAAGATCTGCGATAAAGCCCTGAAAGATGAG	32	N126T	CGATGCATTTCTCTCTTTCTCTATATGCTTATTTG	35
N127	<i>kdsA</i>	N127S	GAAGATCTTTACCTCGTCAGGTAAACAACG	31	N127T	CGATGCATAGTAAATAGCTGACTTATGGATG	31
N128	<i>ibpA</i>	N128S	CGATGCATAACATAGCTCTCTGAAATCAG	30	N128T	GAAGATCTGGCAGTAAAGCGCTGTCCATC	29
N129	<i>ugpB</i>	N129S	CGATGCATCGTTTATCTCTCTTGTGTACCG	31	N129T	GAAGATCTGCTTTCGATACTGGTATGC	29
N130	<i>ompA</i>	N130S	CGATGCATTTTGGCGCTCGTTATCATCC	30	N130T	GAAGATCTGGTGAATCGGTGGTTGGCAG	28
N131	<i>groES</i>	N131S	GAAGATCTAAAAACAGCCAGCCGGTGAC	28	N131T	CGATGCATGTGATAACTCTCTCTTTGGAGAAATGTC	32
N132	<i>flgM</i>	N132S	CGATGCATGGTTTATTCCTCATTGAGGCG	28	N132T	GAAGATCTCAAACTGAACCGCGAGCGCG	28
N133	<i>fljF</i>	N133S	GAAGATCTTTGATGAGTTTGCCCATCC	29	N133T	CGATGCATCGCGACCTCTGGG	22
N134	<i>fljC</i>	N134S	CGATGCATGATCGTTATCTATATGCAAAATGTC	33	N134T	GAAGATCTGGCGGTCTGGAAAGTCGTCT	28
N135	<i>fljD</i>	N135S	GAAGATCTATAGAACTCGACAGCGCAGAC	29	N135T	CGATGCATGCGATTCTCTTTATCTTTCGAC	30
N136	<i>fljB</i>	N136S	CGATGCATTTCCCAACCGAATAACC	28	N136T	GAAGATCTTTGAAAATCGCAGCCCCCTC	29
N137	<i>fljA</i>	N137S	CGATGCATGATAAACAGCCCTGCTTATATGAG	33	N137T	GAAGATCTGTGTCCAAATATGCAAGAGCGC	30
N138	<i>flgK</i>	N138S	GAAGATCTGACTGAATGAAACCGCGAAGC	32	N138T	CGATGCATGGAGGTTCTTATAAGCTTCTC	29
N139	<i>yuhA</i>	N139S	GAAGATCTGAAATTAACGCAACCAATTGTTATTAAGG	38	N139T	CGATGCATGAACACACCTTTATCTTTATCCG	32
N140	<i>ydcZ</i>	N140S	CGATGCATCTTTTATACCTATTTATCATGCCAAC	34	N140T	GAAGATCTTGAGAAGATGGGAGAACTTGGC	31
N141	<i>ycsC</i>	N141S	CGATGCATAAATTTCCGCTCTGTGG	27	N141T	GAAGATCTCAATTTGTCCGAGATGCAGTTTACG	33
N142	<i>setB(yerO)</i>	N142S	GAAGATCTCTTCTGCTACATTACCGGCC	29	N142T	CGATGCATGCTGGTGCATCTGGAAG	27
N143	<i>ptsH</i>	N143S	GAAGATCTGTGATAAAGTCTAGGCATCACC	32	N143T	CGATGCATGTATTTCCCAACTATAGGTTTAG	34
N144	<i>epdI(gapB)</i>	N144S	CGATGCATAGATCTCTCGCAAGGTTTTCC	29	N144T	CGGATCCGCTGGAGTTGGCAATCTTCTG	29
N145	<i>mppA</i>	N145S	GAAGATCTACATGAGCTACAGCAAACTCGC	29	N145T	CGATGCATTAATAATGATCGTAAATTTGTTTCGC	37
N146	<i>pyrG</i>	N146S	CGATGCATGCTGAACCTGAGAAGTTAGG	28	N146T	GAAGATCTGAGGTGATGACGAAGCGCG	28
N147	<i>aceB</i>	N147S	GAAGATCTGAGCTGGCGTAGTCACGG	26	N147T	CGATGCATCGTGACGACTCTCGTCT	24
N148	<i>pcrA</i>	N148S	GAAGATCTCCTGAAGTAATCCGGTAGCAATC	31	N148T	CGATGCATTTCACTGCTCTTAGCAATATG	31
N149	<i>rpsA</i>	N149S	CGATGCATCGAACAATCTCTTTGTGATAAATGAAC	35	N149T	GAAGATCTAAACGTGGCGATCAACAGCAATATC	33
N150	<i>emrR</i>	N150S	CGATGCATGATTAATTAATCAGGAATAATATTCGAC	40	N150T	GAAGATCTGACGTGAGCTTTCTCTTCTCC	29
N151	<i>gltF</i>	N151S	GAAGATCTGAAGTGGCGTTGTTTCTGG	29	N151T	CGATGCATGAACATATCTTAATAACAAATTT	34
N152	<i>ihvI</i>	N152S	GAAGATCTGATGCGCATGATGAGCGTAC	29	N152T	CGATGCATGGCTGCTCTACTGTTTG	26
N153	<i>rhaD</i>	N153S	GAAGATCTTTAAGGGTAAGCGCTGTTCAG	30	N153T	CGATGCATATAAAGTGCCCTTTTAGTTATGTTTC	34
N154	<i>yhaD</i>	N154S	CGATGCATACACTACTCCGGTTATATTTTCTTC	34	N154T	GAAGATCTGTGGTAGATTCTGGCAAAATG	30
N155	<i>ygcL</i>	N155S	CGATGCATTTGTTCTCTCTCATATGCTCC	29	N155T	GAAGATCTGGATGGGTCTGGCAGGGTAA	28
N156	<i>yjiP</i>	N156S	CGATGCATAACTCGCCCTTTGTATAGAC	29	N156T	GAAGATCTCATGACCTTTTAAACCTGCTTG	32
N157	<i>yjiQ</i>	N157S	GAAGATCTGCTGATTAATCTGGTTATCGGG	31	N157T	CGATGCATATTTCTCCACATCCACTGTC	29
N158	<i>exaT</i>	N158S	GAAGATCTAAACGATAGTCTTCCGCAATCTG	32	N158T	CGATGCATGAAGTTTCTGCTAATTCGG	29
N159	<i>yjcR</i>	N159S	CGATGCATGAGCGCGTCTCAATGATATAG	30	N159T	GAAGATCTGGACAGCGAAATGGCGGATC	30
N160	<i>rpsN</i>	N160S	CGATGCATTTAGTGCTCCGCTAATGTCAAC	31	N160T	GAAGATCTCGTACTCTGCAAGGTCCGG	27
N162	<i>rpsL</i>	N162S	CGATGCATTAATAGCTCTCGTTTATGCTTTTG	34	N162T	GAAGATCTGGTTAGATCCGAGACACCC	28
N163	<i>rpsK</i>	N163S	GAAGATCTGGGCTTCAATCGCGCGTAC	26	N163T	CGATGCATTATAAATCTCTCAAGTTGGGTAATAAC	35
N164	<i>rpsA</i>	N164S	GAAGATCTTCAACAAGTCGCGCATTCCTC	27	N164T	CGATGCATGTTTAACTCTCAGGTTTATATTAACGTCT	37
N165	<i>rpsB</i>	N165S	GAAGATCTATCATCTCCAGCACTTCGGC	28	N165T	CGATGCATGATTAACCTCTATATAAAGTTGGG	35
N166	<i>dnaX</i>	N166S	GAAGATCTGGGCGTTGGCTTTGTAC	26	N166T	CGATGCATTGGCAGGCTCTGAAACG	25
N167	<i>gyrA</i>	N167S	GAAGATCTCAAGGCCATATCCAGACC	27	N167T	CGATGCATCTAACCGCTATCCCTCTAC	27
N183	<i>sgaT</i>	N183S	GAAGATCTGTTACCGGTGACTTTGTTGGCC	29	N183T	CGATGCATTCACCTCAATTTTCAAAAGTAATCAC	33
N184	<i>ycsC</i>	N184S	GAAGATCTGGCAGCAGTGGCGTAAATC	27	N184T	CGATGCATGCGCTCTCCCTCTCTG	24
N185	<i>ycsM</i>	N185S	GAAGATCTCTGAGACTTCCAGCTTCAG	28	N185T	CGATGCATATCTTTTCAGCCCGG	24
N186	<i>yjiQ</i>	N186S	GAAGATCTTTTCGACCGTACTGCACCTG	26	N186T	CGATGCATGAGCTATTCGATAAAATTTG	29
N187	<i>yjiR</i>	N187S	GAAGATCTCCGGTTTGAAGGTGCTGG	26	N187T	CGATGCATCGCCATTACCTTCATGATAG	29
N188	<i>ydcK</i>	N188S	GAAGATCTCATGATGACCGTGGCTGTTAG	29	N188T	CGATGCATATAAACGCTCATATACAAAACAATAC	34
N189	<i>ygcR</i>	N189S	GAAGATCTATCTCAGTATATCTGTGCCG	29	N189T	CGATGCATAATCTTCTCGCTTAAAAACAAGAC	35
N190	<i>sdhA (ygeS)</i>	N190S	GAAGATCTCCGCAAAAGCAGTCCAAACC	28	N190T	CGATGCATGCATGATCTACCCGTAG	25
N191	<i>rhlE</i>	N191S	GAAGATCTGGGAGATAAACTTGCTGAGGTTG	31	N191T	CGATGCATAACTACTCCGAACCCGC	25
N199	<i>yhlM/yhlp</i>	N199S	GAAGATCTTCTGATGTTCGTGCCAATG	28	N199T	CGATGCATGCCGATGTTTCCCGG	24